

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA

E.A.P. DE QUÍMICA

**Obtención de Quitosano de Pota (*Dosidicus Gigas*)
empleando altas dosis de Radiación Gamma**

TESIS

para optar el Título Profesional de Químico

AUTOR

Cynthia Lourdes Valenzuela Chamorro

ASESOR

Julio Santiago Contreras

Lima – Perú

2006

I.- INTRODUCCIÓN

La quitina es uno de los biopolímeros más abundantes, después de la celulosa, que se encuentra en la mayoría de los vegetales. La quitina se encuentra como componente de los exoesqueletos de invertebrados y las paredes celulares de algunos hongos y algas. La quitina se produce por biosíntesis en los organismos antes indicados y presenta una tasa de reposición tan alta en la biosfera que se estima duplica a la celulosa.

Los residuos que se obtienen al procesar los mariscos contienen en general un 14-35% de quitina asociada con proteínas (30-40%), lípidos, pigmentos y depósitos de calcio (30-50%). Se estima por tanto una producción mundial anual de quitina en los residuos de unas 1 440 000 toneladas por año. Este gran volumen, unido a su lenta capacidad de degradación, ha estimulado un gran interés para la determinación de los posibles usos de estas sustancias con una doble finalidad. Por un lado la búsqueda de una explotación económica beneficiosa y por otro la eliminación del problema medioambiental.

El quitosano, principal derivado de la quitina, se obtiene industrialmente mediante tratamiento de deacetilación química o enzimático. Dependiendo de las condiciones de reacción, se obtienen quitosanos de diferentes pesos moleculares y grados de deacetilación. Estas variables los hacen útiles para diversas aplicaciones. Actualmente son usados como productos alternativos en el ámbito de la tecnología agrícola como bioestimulantes en el control de plagas y en la protección de semillas y frutos, se utiliza en cosmetología, dadas sus propiedades regenerativas de los tejidos y su potente acción bactericida, en alimentación por ser flocculantes de proteínas y lípidos, y por su acción antiolesterolémica, entre otras⁽¹⁾.

En el presente trabajo se emplearon plumas de Pota, "*Dosidicus gigas*", para obtener quitina y posteriormente quitosano. La quitina obtenida presenta mayor peso molecular comparado con la quitina que se obtiene de Langostino. Así mismo se estudió el efecto de la radiación gamma en la obtención de quitosano de "*Dosidicus gigas*" para compararlo con el método convencional. Se debe remarcar que la radiación gamma no ha sido utilizada

hasta el momento en el proceso de producción de quitosano, lo cual constituye un nuevo método de obtención de este biopolímero. Se ha optado por obtener quitosano de "*Dosidicus gigas*" a fin de conseguir β -quitosano ya que este cuenta con una alta reactividad cualidad que nos permite obtener mayor numero de derivados de quitosano. También en este trabajo se presenta la preparación de hidrogeles de quitosano-PVA, empleando el método de la radiación gamma.

Los hidrogeles son materiales poliméricos entrecruzados en forma de red tridimensional, que tienen la capacidad de absorber una gran cantidad de agua formando materiales blandos y elásticos. Estos hidrogeles pueden prepararse por radiación (rayos gamma)^(2,3,4), electrones⁽⁵⁾, UV⁽⁶⁾ o con la ayuda de agentes de entrecruzamiento químicos⁽⁷⁾. Los hidrogeles tienen aplicación práctica en agricultura y en biomedicina^(8,9).

Actualmente el uso de Radiación Gamma apunta a la obtención de quitosanos de bajo peso molecular. Es ventajoso porque además de ser una técnica efectiva y de bajo costo mantiene la estructura química e incrementa la reactividad del quitosano para futuras derivatizaciones.

II.- OBJETIVOS

2.1.- Objetivos Generales:

- Obtención y caracterización (grado de deacetilación y peso molecular) del quitosano de Pota "*Dosidicus Gigas*" obtenido empleando el método convencional.
- Obtención y caracterización del quitosano de "*Dosidicus Gigas*" obtenido empleando el método de radiación gamma.
- Obtención y caracterización los hidrogeles de quitosano-PVA empleando el método de radiación gamma.

2.2.- Objetivos Específicos:

- Evaluar las propiedades (grado de deacetilación y peso molecular) del quitosano obtenido empleando radiación gamma, en función de la etapa en la que se aplica la radiación gamma.
- Evaluar las propiedades (grado de deacetilación y peso molecular) del quitosano en función de la dosis de irradiación.
- Establecer un método estándar para obtener quitosano de "*Dosidicus Gigas*" en el menor tiempo posible y manteniendo las características adecuadas.
- Establecer los parámetros que determinan el grado de hinchamiento, así como los factores que determinan la formación y estabilidad de los hidrogeles.

III.- PRINCIPIOS TEÓRICOS

3.1.- QUITINA

Los polímeros más abundantes de la naturaleza son la celulosa y la quitina. La diferencia entre estos biopolímeros se encuentra en el grupo hidroxilo del carbono 2, el cual en la quitina ha sido sustituido por el grupo acetamida y cuyo monómero es la 2-acetamido-2-desoxi-**b**-D-glucosa.

La Quitina, un homopolímero de la **b**-(1,4)-N-acetil-D-glucosamina, se encuentra en la mayoría de los vegetales, y es un componente de los exoesqueletos de invertebrados y las paredes celulares de algunos hongos y algas. Se produce por biosíntesis en los organismos antes indicados y presenta una tasa de reposición tan alta en la biosfera que se estima el doble de la celulosa.

El nombre Quitina, Chitin en inglés, viene del vocablo griego *chiton* (χιτων), que significa *malla*⁽¹⁰⁾. Es una macromolécula lineal, su fórmula molecular tiene la forma $(C_8H_{13}NO_5)_n$, cuya masa molecular es de 203.3 g/mol por unidad y aproximadamente 400 000 g/mol la molécula entera.

3.1.1.- OCURRENCIA

La quitina se encuentra, presente en algunos hongos como los ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos, así como en algas como las diatomeas.

Por ser un producto natural, no podemos esperar una composición única. Debe entenderse por esto que las diferentes moléculas del polímero presentan variabilidad entre ellas. La variabilidad abarca su longitud, el porcentaje de grupos amino-acetilos y la posición de estos a lo largo de la cadena.

La quitina obtenida a partir de diatomeas (*Thalassiosira fluviatilis* y *Cyrtotella críptica*) constituye una excepción. Su análisis químico confirma que, en ella, todos los grupos amino están acetilados.

En las diversas matrices, la quitina se asocia de diferentes maneras. Se encuentra unida a proteínas en los exoesqueletos de insectos y crustáceos. Está esclerotizada en las cutículas de insectos al unirse fuertemente con polihidroxifenoles. En el caso de hongos se asocia no sólo con polisacáridos entre ellos, también, con celulosa.

Además de los compuestos orgánicos ya mencionados, la quitina nativa viene acompañada por sales inorgánicas, de las que el carbonato de calcio es el más representativo.

La quitina se obtendrá, entonces, después de realizar sobre la matriz original sucesivos procesos de desproteización en medio alcalino y de desmineralización en medio ácido. Después de cada uno de estos procesos, la muestra se lava sucesivamente hasta alcanzar pH neutro. Finalmente, el material seco se somete a caracterizaciones que definirán sus propiedades como, por ejemplo, el grado de acetilación (GA) o el grado de deacetilación (GD). Cabe destacar la insolubilidad de la quitina en medios ácidos y en la mayoría de los solventes orgánicos⁽¹¹⁾.

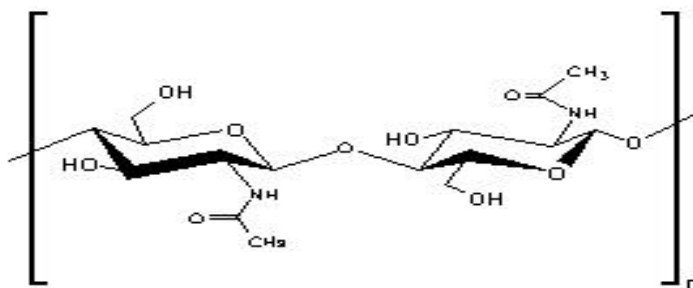


Fig. 1 Estructura química de la quitina (poli-[*b*(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranos a])

3.1.2.- FUENTES DE DESECHOS QUITINOSOS EN IBEROAMÉRICA

Aun cuando la celulosa es el polímero natural más abundante en términos de su ocurrencia estática, la tasa de regeneración de la quitina en la biosfera ($2,3 \times 10^9$ toneladas/año solamente en crustáceos) es casi el doble de la tasa de la celulosa ($1,3 \times 10^9$ toneladas/año). En las costas que bañan los países de Iberoamérica, se capturan y comercializan, en gran

escala, diversas especies de crustáceos que varían según la región geográfica. Se estima que, actualmente, la industria de la captura, la acuicultura y procesamiento de crustáceos y moluscos (langostinos, camarones, cangrejos, centollas, langostas y calamares) genera anualmente, de modo aproximado, 170 mil toneladas de desechos quitinosos sólidos, toda vez que la mayor parte de la producción de estas especies se comercializa en los mercados internacionales con algún tipo de proceso, por ejemplo, descabezado o pelado.

En el ámbito mundial, se ha estimado una producción global de desechos quitinosos de 1'440,000 toneladas/año; este cálculo implica que Iberoamérica contribuye aproximadamente con el 12% de esta cifra. A un rendimiento promedio de 15% de quitina, se tiene que la cantidad de quitina potencial es de aproximadamente 25 mil toneladas. Esta cifra excede notablemente la demanda actual de quitosano en el nivel global, demanda de aproximadamente 10 mil toneladas/año, y es comparable con otros polímeros naturales de origen marino como los alginatos (25 mil toneladas), y superior a la de carrageninas (12 mil toneladas) y agar-agar (7 mil toneladas)⁽¹²⁾.

a) Principales géneros y especies de crustáceos

A continuación, se presenta un listado de los géneros y especies de crustáceos y moluscos, así como los nombres comunes locales y la distribución geográfica de cada uno.

Camarones

- *Litopenaeus vannamei* -anteriormente *Penaeus vannamei*- (camarón blanco del Pacífico, camarón patiblanco, langostino rojo). Se distribuye en el Pacífico Centro Oriental desde Sonora (México) hasta el norte del Perú. Es, además, una de las principales especies cultivadas.
- *Litopenaeus stylirostris* -anteriormente *Penaeus stylirostris*- (camarón azul, langostino blanco). Se extiende en el Pacífico Centro Oriental desde México hasta Perú.
- *Farfantepenaeus californiensis* –anteriormente *Penaeus californiensis*- (camarón café). Se encuentra en el Pacífico Centro Oriental en México.
- *Farfantepenaeus aztecus* -anteriormente *Penaeus aztecus* - (camarón café). Se distribuye

en el Atlántico Centro Occidental en el Golfo de México.

- *Far/antepenaeus brevirostris* -anteriormente *Penaeus brevirostris*- (camarón rojo). Se distribuye en el Pacífico Centro Oriental desde el sur de México hasta Perú.
- *Litopenaeus setiferus* -anteriormente *Penaeus setiferus*- (camarón blanco del Atlántico). Se encuentra en el Atlántico Centro Occidental en el Golfo de México.
- *Far/antepenaeus brasiliensis* -anteriormente *Penaeus brasiliensis*- (camarao lixo, camarao rosa, camarón rosado con manchas). Se encuentra en el Atlántico Occidental en Brasil.
- *Xiphopenaeus reedi* (títí). Se encuentra en el Pacífico Centro Oriental en Panamá.
- *Xiphopenaeus kroyeri* (camarao sete barbas o camarao chifrudo, camarón siete barbas). Se encuentra en el Atlántico Sur y Centro Occidental, en Brasil, Venezuela, Colombia, Honduras y en el Golfo de México.
- *Heterocarpus reedi* (camarón nailon). Se encuentra en el Pacífico Sur Oriental, en Chile.
- *Pleoticus muelleri* (camarón, camarón pelágico). Se encuentra en el Atlántico Sur Occidental, desde Río de Janeiro hasta Santa Cruz en Argentina.
- *Parapenaeus longirostris* (gamba). Se encuentra en el Mar Mediterráneo, en España.
- *Crangon crangon* (quisquilla, cabra, camarao mouro). Se encuentra en el Atlántico Nororiental desde Noruega hasta Marruecos y en el Mar Mediterráneo, en España y Portugal.

Cangrejos

Los cangrejos de importancia comercial pertenecen a diversas familias del infra orden *Brachyura*. En las estadísticas de desembarcos, no están diferenciadas todas las especies de importancia comercial, y la mayor parte de la captura se reporta genéricamente como cangrejos marinos. A pesar de ello, a continuación se presentan las especies más frecuentes en Iberoamérica.

- *Callinectes sapidus* (jaiba azul del Atlántico). Se encuentra en el Atlántico Centro Occidental desde el Golfo de México hasta el norte de Argentina.
- *Callinectes arcuatus* (jaiba azul del Pacífico, cangrejo). Se distribuye en el Pacífico Centro y Sur Oriental desde Baja California hasta Perú. Llega a encontrarse en Chile durante el Fenómeno de El Niño.
- *Callinectes danae* (jaiba dana). Se encuentra en el Atlántico Centro Occidental desde el Golfo de México hasta el sur de Brasil.
- *Geryon quinquedens*. Se encuentra en el Atlántico Sur Occidental. .
- *Lithodes antarctica* (centolla). Se encuentra en el Pacífico Sur Oriental y en el Atlántico Sur Occidental, en Chile y Argentina.
- *Paralomis granulosa* (centollón). Se encuentra en el Pacífico Sur Oriental y en el Atlántico Sur Occidental, en Chile y Argentina.
- *Cancer pagurus* (buey). Se halla ampliamente distribuido en la costa del Atlántico Oriental europea y en el Mar Mediterráneo, en España y Portugal.

Langostas y langostinos

- *Panulirus argus* (langosta). Se encuentra en el Atlántico Centro y Sur Occidental desde el Golfo de México hasta Río de Janeiro, incluido el Mar Caribe, en Cuba, México,

Honduras, Nicaragua y Brasil.

- *Panulirus gracilis* (langosta verde). Se encuentra en el Pacífico Centro Oriental desde Baja California y México hasta Panamá.
- *Pleuroncodes monodon* (langostino colorado). Se encuentra en el Pacífico Sur Oriental, en Chile.
- *Cervimunida johni* (langostino amarillo). Se distribuye en el Pacífico Sur Oriental, en Chile.
- *Nephrops norvegicus* (cigala, langostino). Se encuentra en el Atlántico Nor Oriental desde Noruega hasta Marruecos y en el Mar Mediterráneo, en España y Portugal.

Calamares

En este caso, únicamente se consideran aquí las especies a las que se asume que se les elimina la pluma industrialmente, dado que su carne se comercializa en forma procesada.

- *Dosidicus gigas* (calamar gigante, pota). Se encuentra en el Pacífico Centro y Sur Oriental desde el Golfo de California hasta Perú.
- *Illex argentinus* (calamar), se encuentra en el Atlántico Sur Occidental (aproximadamente entre los 30° a 50° S), en Brasil, Uruguay y Argentina.
- *Sepia officinalis* (choco, jibia). Se encuentra en el Atlántico Nor Oriental y el Mar Mediterráneo, en España y Portugal⁽¹³⁾.

Fig. 2 *Litopenaeus vannamei*



Fig. 3 *Crangon crangon*



Fig. 4 *Callinectes sapidus*



Fig. 5 *Cancer Pungurus*



Fig. 6 *Panulirus argu*



Fig. 7 *Panulirus gracilis*



Fig. 8 *Dosidicus gigas*



Fig. 9 *Sepia officinalis*



b) Obtención de Pota en el Perú

La mayor cantidad de Pota se obtiene principalmente en Tumbes, Talara, Paita, así mismo en la Tabla 1. Se observa que el desembarque de Pota ocupa un quinto lugar lo cual nos da una idea de la cantidad de residuos quitinosos.

El calamar gigante o pota "*Dosidicus gigas*" es una especie pelágica oceánica que realiza migraciones hacia la costa relacionadas con procesos de alimentación y reproducción.

En el Perú, la extracción se realiza a nivel industrial y artesanal, la primera es la más importante y se inició en 1991, a través de barcos calamareros de 190 a 500 TRN, provistas de máquinas automáticas de pesca con poteras y luces de atracción; y la segunda se desarrolla principalmente al norte de los 6°S, a bordo de embarcaciones artesanales de 2 a 8 toneladas de capacidad de bodega, mediante el uso de redes cortineras y poteras manuales⁽¹⁴⁾.

Tabla 1. Desembarque de Especies Marinas –2002 (TMB Ministerio de la Producción-Perú)⁽¹⁵⁾.

Especie	Total general	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
	60,187	11,731	7,002	4,736	2,123	1,824	3,354	3,250	5,964	5,335	3,778	4,642	6,648
JUREL	17,506	8,103	4,527	2,062	80	0		38	196	594	419	562	925
ANCHOVETA	13,364	36	133	64	96	223	1,320	1,356	811	1,648	1,054	2,060	4,560
ATUN/Tuno	5,648	522	250	1,235	939	338	17	19	625	673	238	630	162
CABALLA	5,382	1,491	1,315	470	139	32	93	185	361	468	452	51	323
POTA	4,999	72	62	0	197	63	33	540	2,352	807	442	289	143
MACHETE	4,851	208	102	46	56	354	931	445	993	565	406	475	270
SARDINA	4,055	1,288	557	264	81	253	258	202	330	200	246	300	77
BAGRE	1,646	-	-	-	257	316	415	202	66	188	141	57	5
TAMBORIN/Meiva	345	-	-	-	-	-	1	5	1	-	21	159	157
ABALON/Chanque/Tolina	286	5	0	1	-	-	-	35	92	83	54	14	3
LORNA	277	3	-	-	-	-	14	105	-	61	92	3	-
BARRILETE	270	-	-	84	36	-	87	-	5	10	34	11	2
Concha NAVAJA	199	-	4	4	12	17	20	3	45	30	22	28	14
CHAVELO	52	-	-	-	-	-	-	-	52	-	-	-	-
MERLUZA	42	-	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEZ CINTA/Pez Correa	22	-	-	-	-	-	-	-	22	-	-	-	-
CARACOL	22	-	4	0	-	-	1	7	8	1	0	-	-
PEJERREY	20	1	-	8	-	-	-	-	-	6	-	-	6
LISA	11	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-
VOLADOR	7	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ALMEJAS	5	-	-	-	-	0	-	-	-	-	1	3	2
CALAMAR	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OTROS MARISCOS	3	-	0	0	3	0	-	-	-	0	0	0	0
OTROS PECES	1,169	1	1	497	226	16	162	109	2	0	155	-	-

Las mayores capturas de este recurso correspondieron a los años 1991 a 1995, durante los cuales se registraron de 80 mil a 200 mil toneladas anuales.

Esta especie presenta una alta tasa de crecimiento y puede alcanzar grandes tamaños que puede superar un metro de longitud de manto y pesos totales mayores de 25 kg⁽¹⁶⁾.

Hay algunas ventajas asociadas a considerar la explotación comercial de pluma de calamar para obtener quitina. Los rendimientos son mayores que en el caso del desecho de los crustáceos (quitina > 40%) y se prescinde de la necesidad de eliminar materia mineral (cenizas < 1,0%). Al suprimirse la desmineralización ácida, se reduce la hidrólisis y la quitina tiene una mejor calidad. No obstante, la explotación de la pluma del calamar depende directamente de la disponibilidad existente en los países donde se procesa este recurso. Actualmente, las fuentes principales de desechos aprovechadas para producir quitina comercialmente en el mundo son los crustáceos.

A su vez, es importante subrayar que la característica principal de la composición del desecho de los cangrejos -por ejemplo *Callinectes spp.*- es el alto contenido de materia mineral-casi 40% del peso del desecho fresco. La presencia de esta materia inorgánica

calcárea dificulta mucho el tratamiento subsiguiente de la materia prima para la recuperación de productos de valor, ya que le confiere alta dureza mecánica y complica la separación de la proteína y los pigmentos durante su aislamiento. A su vez, la selección del biodesecho a utilizarse como materia prima para la obtención de quitina y quitosano debe hacerse teniendo en cuenta las cantidades disponibles, la composición química, las impurezas incluidas, la zona geográfica, la época del año y la aplicación deseada. Estas variables condicionarán inevitablemente los protocolos de proceso a emplear⁽¹⁷⁾.

Tabla 2. Composición química representativa de diversos tipos de desechos quitinosos industriales⁽¹⁸⁾

<i>Composición química</i>					
Fuente	Proteína (%)	Ceniza (%)	Lípidos (%)	Quitina (%)	Astaxantina (mg/kg)
<i>Litopenaeus stylirostris</i> (cabeza de camarón)	42±1,8	20,5±0,5	2,4±0,02	35,5±2,1	88,2
<i>Litopenaeus spp.</i> (cáscara de camarón)	58±2,8	24,2±0,3	1,4±0,02	16,4±1,8	n.d
Desecho de langosta	23,1	33,7	2,2	20,2	983
Desecho de Krill (<i>Euphausia superba</i>)	41	23	11,6	24	n.d
Caparazón de <i>Callinectes spp.</i>	13,1±1,2	72,4±0,5	0,8±0,1	13,8±0,2	36
Pluma de calamar <i>Dosidicus Gigas</i>	55,3±3,1	0,9±0,04	0,6±0,03	43,2±2,4	-

3.1.3.- ESTRUCTURA CRISTALINA

La quitina muestra su alto nivel de cristalinidad por medio de sus espectros de rayos X. Se han detectado tres formas polimórficas denominadas α , β , y γ -quitina. La diferencia entre ellas esta en la disposición de las cadenas en la región cristalina.

a-quitina, se presenta en disposición antiparalela está cristalizado con una celda unidad de dos cadenas (figura 10). Los trabajos realizados sobre la forma a proponen que la celda unidad es ortorrómbica y posee las siguientes dimensiones: $b=1,046$ nm, $c=1,925$ nm y $a=0,925$ nm.

b-quitina, Dweltz estableció que la celda unidad, en este caso, contenía una sola cadena de quitina que necesita una estructura en orientación paralela (figura 11). Gardner y Blackwell refinaron su estructura y determinaron una celda unidad monoclinica con las siguientes dimensiones: $a=0,485$ nm, $b=0,926$ nm, $c=1,038$ nm y $\gamma=97,5^\circ$.

g-quitina, Se encuentra dos cadenas paralelas en un sentido y la siguiente en el sentido opuesto⁽¹⁹⁾.

La α -quitina esta asociada a zonas de alta dureza como la cutícula de artrópodos y justifican su asociación con las proteínas esclerotizadas y los carbonatos, a diferencia de las otras 2 formas que se ubican entre los materiales duros pero, a la vez, flexibles. En los calamares de la especie lóligo, se han encontrado los tres tipos de quitina: la α -quitina, como una delgada capa en la pared del esófago y del estomago; la β -quitina, que constituye un gran porcentaje de la pluma o espina a la que imprime su carácter transparente y flexible; y la γ -quitina, que se presenta como una cutícula gruesa que recubre otras zonas del estomago⁽²⁰⁾.

La α -quitina es la forma más estable; ello se ve confirmado por la tendencia de transformación de las otras dos a esta forma. Durante el cambio morfológico se aprecia una significativa disminución en la longitud de las cadenas. Estos cambios han sido estudiados por espectroscopía en estado sólido RMN ^{13}C CP/MAS y de plasma asociado a espectrometría de masas⁽²¹⁾.

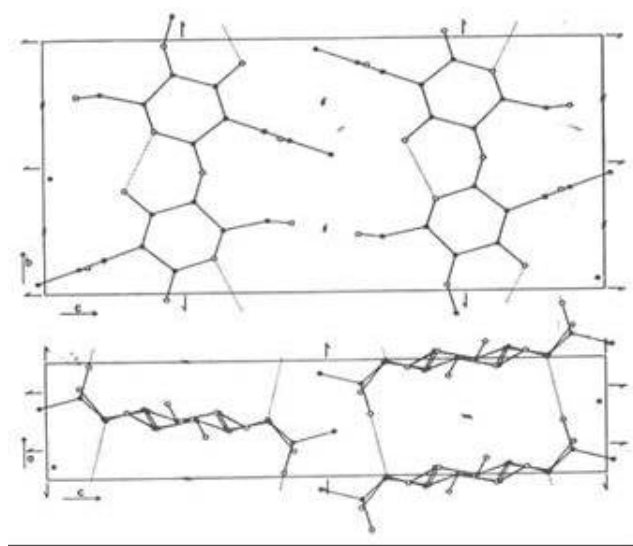


Fig. 10 Estructura cristalina de la α -quitina . La celda es ortorrómbica y tiene dos cadenas, una hacia arriba y la otra abajo. Las cadenas tienen la misma polaridad que enlaces de hidrógeno a través de los planos de $C=O \cdots H-N$ perpendicular al eje de la fibra.

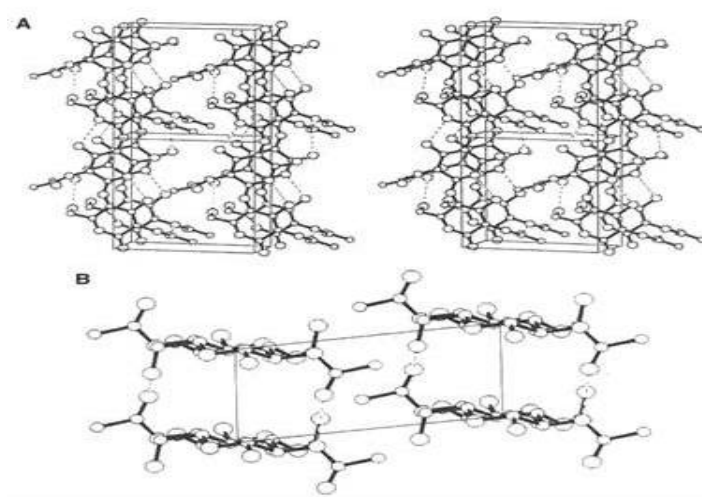
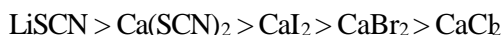


Fig. 11 Estructura Cristalina de la β -Quitina. (A) Vista espacial de dos celdas unitarias aproximadamente normal al plano bc . Las dos cadenas en la parte de atrás y adelante se encuentran unidas por enlaces de puentes de hidrógeno. (B) Proyección de una celda unitaria a lo largo del eje c con a y b atravesando la página.

3.1.4.- SOLUBILIDAD DE LA QUITINA

La quitina es un material insoluble en la mayoría de solventes. Es factible disolverla en los siguientes sistemas:

- **Soluciones de sales neutras:** La quitina se solubiliza con un alto grado de hidratación, en caliente. La eficiencia de disolución sigue la siguiente secuencia:



Al añadir etanol a la solución de quitina en sales neutras, se observa la formación de una masa gelificada. La velocidad de disolución de la β -quitina en estos medios es superior a la α -quitina⁽²²⁾.

- **Medio Ácido:** La quitina se solubiliza en HCl, H₂SO₄ y H₃PO₄ concentrados; sin embargo, al mismo tiempo se producen reacciones de hidrólisis. En el caso del ácido sulfúrico, se presentan además reacciones de sulfatación. La disolución de quitina en HCl concentrado contiene cadenas de quitina más corta que las originales. La hidrólisis de la quitina con ácidos concentrados bajo condiciones agresivas produce D-glucosamina.

Comparando la solubilidad de la quitina en ácidos orgánicos, la β -quitina se disuelve en ácido fórmico, mientras que la α -quitina no lo hace.

Otros autores confirmaron que la concentración entre 88% y 90% (p/p) de ácido fórmico es la óptima para disolver la β -quitina. Observaron además, que se logra disolver levemente la α -quitina en ácido fórmico al 98% (p/p).

- **Solventes Orgánicos:** Los solventes orgánicos comunes no disuelven quitina; sin embargo, mezclas de metilformamida y tetraóxido de dinitrógeno logran soluciones de baja concentración: alcanzan solamente valores del orden de 1g/L. Resulta interesante la observación de Allan, quien mediante espectroscopia Infrarroja, comprobó que, tanto el material inicial como el recuperado de estas soluciones, presentan idénticas señales. Ello confirma que el proceso no implica una modificación química⁽²³⁾.

Es posible disolver quitina en hexafluoro-2-propanol o en hexafluoroacetona. Cloroalcoholes en conjugación con soluciones acuosas de ácidos minerales también disuelven la quitina.

3.1.5.- REACTIVIDAD DE LA QUITINA

Las modificaciones de la quitina son generalmente difíciles debido a su reducida solubilidad. La mayoría de reacciones heterogéneas producen bajos grados de reacción, reducida selectividad, falta de uniformidad estructural en el producto y degradación parcial del polímero por las condiciones severas de reacción. Por lo tanto, para llevar a cabo modificaciones químicas en la quitina son deseables reacciones en soluciones (homogéneas) y bajo condiciones suaves.

Así, la solubilización de este polisacárido es crucial en este aspecto. Entre los intermediarios solubles más comunes están la quitina soluble también denominada quitina alcalina, la quitina ftaloilada, la quitina sililada, la quitina tosilada y el yoduro de quitina. Estos compuestos logran evitar la formación de interacciones intermoleculares fuertes principalmente, enlace de hidrógeno entre las cadenas. La posibilidad de modificar la quitina de manera controlada sin disminuir la longitud de las cadenas permitirá el desarrollo de nuevas aplicaciones y la aparición en el mercado de nuevos productos comerciales⁽²⁴⁾.

a) Hidrólisis de la cadena principal: Los enlaces glicosídicos en la quitina son relativamente estables en medio alcalino, pero muy sensibles en medios ácidos. Así, la quitina se degrada parcialmente por hidrólisis ácida y oxidación aun bajo condiciones suaves. Según las condiciones de reacción y el ácido empleado, los productos pueden ser oligómeros o monómeros. Por ejemplo, la hidrólisis con ácido clorhídrico forma oligómeros de 2 a 4 unidades repetitivas, además del monómero. Otra manera de hidrolizar la quitina es por acción enzimática; por ejemplo, utilizando hidrolasas, lisozimas, quitosanosas, etc.

b) Deacetilación: Los grupos N-acetilo de la quitina son eliminados por hidrólisis alcalina bajo condiciones heterogéneas. En algunos casos, estas reacciones se llevan a cabo en soluciones acuosas concentradas de bases, como hidróxido de sodio o de potasio, bajo condiciones severas (100-160 °C). Las condiciones bajo las que se lleva a cabo la

reacciona determinan el grado de deacetilación, pero también pueden reducir la longitud de las cadenas. La ausencia de oxígeno o la presencia de un antioxidante contribuyen a disminuir la pérdida de peso molecular del polímero.

En el caso de la β -quitina, su deacetilación es más rápida que la de la α -quitina, esto es debido a la menor cristalinidad de la β -quitina, debida a la debilidad de sus fuerzas intermoleculares. Las reacciones en soluciones alcalinas concentradas a temperaturas altas (mayores a 100°C) tienen a producir quitosano de color pardo.

La deacetilación de la quitina soluble o quitina alcalina es un proceso homogéneo, más eficiente y se produce de manera aleatoria, pero uniforme, a lo largo de la cadena del polímero. Los productos obtenidos por los procesos homogéneo y heterogéneo, aun con el mismo grado de acetilación, a menudo muestran grado de acetilación, por lo general muestran comportamientos diferentes que se deben a la variación en las distribuciones de las diferentes unidades repetitivas (glucosamina y N-acetilglucosamina).

3.1.6.- APLICACIÓN DE LA QUITINA

Se ha mencionado anteriormente que la quitina por su insolubilidad no es muy útil, sin embargo sus derivados suelen tener muchas aplicaciones: Para contrarrestar distintos problemas en distintos campos como en la agricultura, tecnología del medio ambiente, industria farmacéutica, ingeniería de tejidos, en medicina, etc.

Una interesante aplicación práctica del análisis de quitina como tal, se utiliza para evaluar la contaminación de hongos en materiales como plantas, madera, granos, hojas, raíces; debido al interés de identificar dicha contaminación sin la necesidad de separar los hongos del tejido vegetal. Una muestra se hidroliza y luego se analiza químicamente por los productos de la degradación de la quitina, la N-acetil-D-glucosamina, utilizando entre otras técnicas, enzimas específicas como la Chitobiose (N-acetilglucosaminidasa)⁽²⁵⁾.

3.2.- QUITOSANO

El Quitosano es el derivado N-deacetilado de quitina, por lo tanto el quitosano es una amina primaria, y su monómero es 2-amino-2-desoxi- β -D-glucosa. La quitina y el quitosano son comercialmente importantes debido a su alto contenido de nitrógeno. Además son recomendados como posibles sustituyentes de los polímeros sintéticos debido a que estos tienen excelentes propiedades tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad, toxicidad nula, etc⁽²⁶⁾.

El Quitosano (poli[β -(1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glucosa]) se obtiene por modificación química de la quitina, la cual es tratada con una solución alcalina concentrada y caliente, el polímero que se obtiene posee un comportamiento marcadamente básico debido al grupo amino libre en su estructura, lo cual además le proporciona ciertas características fisicoquímicas de gran interés industrial.

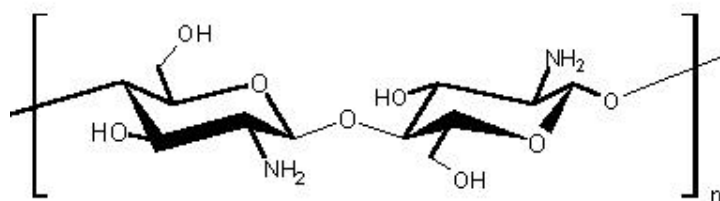


Fig. 12 Estructura del Quitosano

3.2.1.- OCURRENCIA

El quitosano muy raramente se encuentra en la naturaleza, en contraste a la quitina. Se puede encontrar en ciertos hongos como *Mucor rouxii*, la fuente más conocida de quitosano⁽²⁷⁾.

3.2.2.- OBTENCIÓN DE QUITOSANO A PARTIR DE LA QUITINA

La principal reacción de derivatización de la quitina es la hidrólisis de los grupos acetamida para generar el polímero deacetilado quitosano. Aunque las amidas, en principio, pueden hidrolizarse bajo condiciones ácidas o alcalinas, se excluye el uso de hidrólisis ácida debido a la susceptibilidad a la misma de los enlaces glicosídicos de la quitina. Esta reacción se conduce bajo condiciones alcalinas muy severas, debido a la combinación de tres factores: 1) la baja reactividad debida a configuración *trans* de los sustituyentes acetamida con respecto al grupo OH-3 del anillo piranósico de la unidad monomérica; 2) la presencia de enlaces de hidrógeno entre grupos carbonilo y amida de cadenas adyacentes; y 3) el denso empaquetamiento de las cadenas en el enrejado cristalino de la quitina, que previene el acceso del álcali a los sitios reactivos. Normalmente, son necesarios tratamientos térmicos de la quitina en soluciones acuosas muy concentradas con el objetivo de deacetilar parcialmente el polímero y obtener el quitosano. La deacetilación completa difícilmente se alcanza y normalmente no es necesaria el producto obtenido se llama “*quitano*”, ya que la solubilidad en soluciones de ácido diluido se logra a partir de un grado de deacetilación de 60%. El criterio utilizado para distinguir entre quitina y quitosano es precisamente la solubilidad de este último en soluciones de ácido diluido. El quitosano, por lo tanto, no es una entidad química única y definida, sino que designa a una familia de polisacáridos que varían entre sí en su composición y tamaño molecular. Esta variabilidad se asocia especialmente a las condiciones del proceso de obtención⁽²⁸⁾.

a) Deacetilación homogénea y heterogénea

La conversión de quitina a quitosano puede realizarse por dos metodologías: deacetilación en fase heterogénea o deacetilación en fase homogénea. La deacetilación termoalcalina heterogénea, altas temperaturas y cortos tiempos se lleva a cabo en la quitina sólida en medio alcalino. La reacción se produce, preferentemente, en las regiones amorfas del polímero. En la actualidad, este es el tratamiento que se emplea comúnmente en la industria a escala mundial. Por su parte, la deacetilación homogénea, comienza con un pre-tratamiento de hinchamiento, posteriormente la eventual disolución completa de la quitina en frío (-0°C) mediante la utilización de una relación de quitina a NaOH (p/p) de 1:10. Luego, se la somete acción a temperaturas cercanas a la del ambiente durante períodos

largos Esto permite que la reacción no se localice en determinados lugares de la cadena y que el ataque a los grupos amida sea más uniforme. En general, se requiere un polímero uniforme, con propiedades fisicoquímicas específicas, sin embargo, sólo la preparación vía enzimática promete producir quitosanos más homogéneos.

b) Condiciones de reacción

Independientemente de si la deacetilación se produce bajo condiciones homogéneas o heterogéneas, esta reacción implica el uso de soluciones concentradas tiempos relativamente largos que pueden variar entre 1 y 80 horas según el tipo de proceso. En la práctica, el máximo nivel de deacetilación que se puede a un tratamiento simple es de, aproximadamente, 75-85%. En general, deacetilación, las condiciones de reacción se seleccionan de manera tal que un nivel de conversión suficiente en un tiempo razonable y se origine un producto soluble en disoluciones ácidas diluidas sin que haya una degradación significativa de la cadena polimérica.

El límite superior de la deacetilación aumenta con el incremento de la concentración de la solución de NaOH y también con la temperatura de la reacción.

Almuniary Zainuddin, estudiaron varias concentraciones de soluciones de NaOH (desde 30% a 65% p/v) con el objeto de obtener quitosanos a temperatura ambiente. Estos investigadores encontraron que obtenían quitosanos tratando quitina con NaOH al 50% durante 6 días, con NaOH al 55% por 5 días y con NaOH al 60% y 65 % en 4 días. Sin embargo, no fue posible producir quitosano al utilizar concentraciones de álcali menor del 45%, aunque se trató la quitina durante 30 días⁽²⁹⁾.

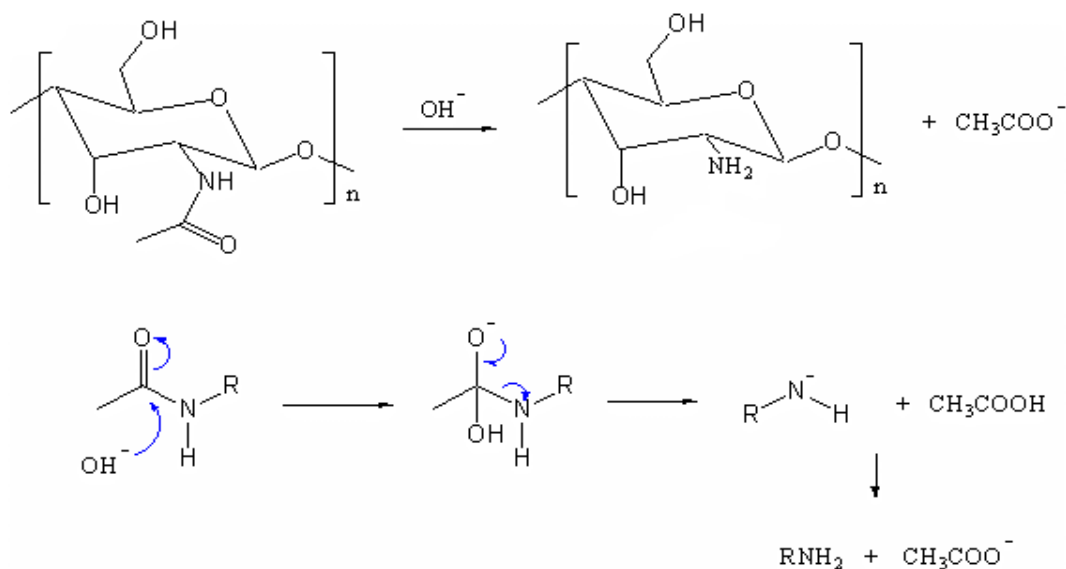


Fig. 13 Mecanismo de Reacción de Deacetilación de la Quitina para obtener Quitosano mediante hidrólisis alcalina.

c) Cinética de la N-deacetilación de la quitina

La reacción de N-deacetilación de la quitina se corresponde con una hidrólisis en la que el ion hidróxido, fuertemente nucleófilo, ataca a la amida mediante un mecanismo de sustitución nucleofílica S_N2 . En la práctica, los procesos termoalcalinos convencionales de N-deacetilación de quitina implican el uso de grandes volúmenes de álcali concentrado, que tiene la función dual de actuar como reactivo y medio de reacción. Dado que el NaOH está presente en un exceso con respecto a la concentración de moles de quitina, en diversos estudios de deacetilación de α -quitina y β -quitina, se ha demostrado, firmemente, que la reacción procede de acuerdo con un mecanismo de pseudo primer orden:

$$\ln(y) = -k' t + \ln(y)_{t=0} \quad (1)$$

En la ecuación 1, y representa el grado de conversión efectiva total del proceso, expresado como moles de glucosamina por moles de N-acetilglucosamina. El valor de la constante k' se sabe que depende de la temperatura, la concentración de álcali, la relación de peso de quitina por volumen de solución de álcali y el tipo de proceso utilizado.

Hasta el momento, solamente se puede afirmar que el pre-hinchamiento de la quitina en álcali, que conduce a la destrucción completa de la estructura nativa cristalina, tiene un efecto neto sobre la cinética de la reacción⁽³⁰⁾.

3.2.3.- INNOVACION EN LA PREPARACIÓN DE QUITOSANO

En el libro “Handbook de quitina” editado por Ricardo A.A. Muzzarelli y Martín G. Peter, se ha recopilado la información científica relacionado a la preparación y caracterización de quitina y sus derivados.

Las propiedades y aplicación de la quitina y sus derivados se ha venido incrementando rápidamente, es así que y a dado lugar al desarrollo de las siguientes innovaciones en la preparación de quitosano:

- **Patente de Estados Unidos : 4,195,175 : Peniston , et al. : 25 de Marzo, 1980**

Esta invención involucra un proceso de obtención de quitosano a partir de quitina en el cual se reduce la temperatura de deacetilación, se incrementa las proporciones de concentraciones altas de álcali y se usa aire estático en el proceso final de deacetilación.

Se ha aumentado el rendimiento de quitosano, se ha empleado en el proceso de obtención de 35 a 50% de solución de hidróxido de sodio, calentando la mezcla de 40 a 80° C por 160 a 140 horas, removiendo la solución de álcali, lavando y secando el quitosano obtenido.

La reacción de deacetilación es fuertemente dependiente de la concentración de álcali; así mismo el tiempo requerido para la deacetilación de quitina empleando 50% en peso de hidróxido de sodio a 120°C es cerca de 4 horas, mientras que empleando 40% de hidróxido de sodio se requieren cerca de 8 horas.

- **Patente de Estados Unidos: 5,053,113: Krepets , et al. : 1 de Octubre, 1991**

Quitina y quitosano son producidos por tratamiento alcalino de quitina que contiene fragmentos de material crudo, este proceso incluye proceso electroquímico con una solución de hidróxido de sodio.

Varios procesos en el cual se usa corriente eléctrica a través de la solución de NaOH conteniendo una igual distribución de partículas de quitina que contienen materiales que

causan un rompimiento de los enlaces químicos entre quitina y proteínas, carotenoides, lípidos y sustancias minerales estas son: 1) Disociación eléctrica con movimiento de los productos de la disociación hacia la carga positiva y negativa de los electrodos 2) Hidrólisis catalítica en presencia de un catalizador (NaOH).

- **Patente de Estados Unidos: 5,232,842: Park , et al.: 3 de Agosto, 1993**

En este trabajo se prepara quitosano por inoculación a un hongo filamentoso el cual pertenece a la familia Mucoraceae. Para la pre-cultivación se emplea extracto de malta, peptona, glucosa y sulfato de magnesio.

- **Patente de Estados Unidos: 6,310,188: Mukherjee, et al. : 30 de Octubre, 2001**

Este método es innovador para mejorar la eficiencia de obtención de quitina y quitosano. En este proceso los caparazones de crustáceos son mantenidos a altas temperaturas por tiempo establecido para su conversión a quitina.

Quitina y quitosano de alta pureza son producidos a bajo costo en comparación con los métodos convencionales. Es posible que luego del calentamiento, el material sea más sensible al ataque de álcalis o ácidos durante el proceso. Así mismo durante el proceso se usa menos cantidades de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio, esto hace que el proceso entero sea más económico y menos contaminante.

- **Patente de Estados Unidos: 6,890,913: Chan , et al.: 14 de Octubre, 2003**

En este trabajo se obtiene un quitosano de peso molecular promedio de 50,000-140,000 g/mol y grado de deacetilación de 85-95%. Así mismo también se detalla el método para obtención de Quitosano a partir de hongos. Un ejemplo particular de el hongo usado para este trabajo es Actinomucor taiwanese. El crecimiento de el cultivo de este hongo es a una temperatura de 15-24°C. El quitosano obtenido presenta actividades anti-cancerígenas.

- **Patente de Estados Unidos: 6,632,941: Wooten , et al.: 14 de Octubre, 2003**

En este trabajo se emplea el proceso físico de disminución de tamaño de partícula hasta partículas uniformes; este proceso substancialmente minimiza el uso de fuertes agentes químicos y los subsecuentes residuos ⁽³¹⁾.

- **Patente Europea MXPA02009042: Fan Weiyu : 25 de Abril, 2003**

Se obtiene un quitosano de alto grado de deacetilación de una biomasa microbiana, este método incluye el desarrollo de quitina contenido en la biomasa, reaccionando esta quitina con solución cáustica de mas de 25% de álcali a temperatura mayor de 95° por un periodo de 10 horas para convertir la biomasa de quitina en quitosano, finalmente se separa el quitosano de la solución cáustica.

- **Patente Europea AU2003221828: Trinkle James, et al. :17 de Octubre, 2003**

Esta invención desarrolla un método para producir quitosanos funguicidas a partir de materiales que contengan quitina usando presiones mayores de 0 PSIG (libra por pulgada cuadrada calculada) . Esta invención lleva a cabo la producción de quitosano con el incremento de los niveles de deacetilación comparado con un proceso similar que no usa el incremento de presión.

- **Patente Europea: UA61373: Finko Serhii Volodymyrovych :17 de Noviembre, 2003**

En este trabajo se emplea un doble tratamiento después de moler la caparazón de los crustáceos, estos son tratados con ácido sulfúrico al 4%, posteriormente con solución de soda cáustica al 4%, seguidamente el producto es lavado y secado. Quitosano es obtenido con 50% de soda cáustica a 100° por 30 minutos.

- **Patente Europea: UA62138: Finko Serhii Volodymyrovych :15 de Diciembre, 2003**

Esta invención desarrolla un método para la producción de quitosano incluye el uso de insectos como fuente de quitina cruda; el tratamiento empieza con una solución de un ácido inorgánico fuerte por algunas horas mientras se va mezclando a temperaturas de 18-30° C y una relación de fase sólida y líquida de 1: (3-4) en peso, posteriormente se lava la fase sólida, tratándola después con 2-5% de solución alcalina por 1.5- 3 horas en una relación de fase sólida y líquida de 1:(3-5) en peso mientras se va mezclando a una temperatura de 90-100°C sin presencia de aire, lavando separadamente el sedimento con solventes hidrofílicos y hidrofóbicos, secando y separando el sedimento (quitina), posteriormente se realiza un doble tratamiento a la quitina obtenida con 45-50% solución acuosa-alcohólica mientras se mezcla a una temperatura de 100-110°C bajo la acción de ultrasonido con frecuencia de 20-30 kHz por 1.5-2.5 horas, sin presencia de aire y la proporción de fase sólida y líquida es de 1: (3-5) en peso. Escarabajos y cucarachas en todas formas de sus periodos de desarrollo son usados como fuentes de quitina cruda.

- **Patente Europea: AU2003248668: Chen Li Fu, et al.: 31 de Diciembre, 2003**

En este trabajo se incluye un quitosano soluble en agua, así como otro soluble en ácidos; ambos quitosanos tienen una estructura amorfa. La estructura amorfa del quitosano soluble en ácidos permite una solubilidad en el rango de pH de hasta 6.5. La estructura amorfa del quitosano soluble en agua de la presente invención permite la solubilidad de este quitosano en rangos de pH ácidos, neutros y básicos.

- **Patente Europea: CN1473856: Chen Guohua , et al.: 02 de Febrero, 2004**

La obtención de quitosano de bajo peso molecular incluye la adición de quitosano de alto peso molecular en una solución de pH de 1-3, esta solución es una mezcla de H_2O_2 y $FeSO_4$ así mismo se deja en agitación por 30-60 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adiciona una solución de álcali para regular a pH alcalino, separando los sólidos, lavando hasta neutralidad y secando en el vacío. De la solución de mezcla, la relación molar entre H_2O_2 y el ion ferroso es de 4-8. La presente invención tiene como

ventaja de ser capaz de preparar varios tipos de quitosano de bajo peso molecular con alto rendimiento y corto tiempo de degradación a temperatura normal.

- **Patente Europea: CN1515676: Chen Meihui, et al.: 28 de Julio, 2004**

La presente invención relata un método para producir quitina y quitosano a partir del cultivo de los hongos taiwaneses de la especie *rhizopus azygosporus* o *actinumucor*.

- **Patente Europea: CN1534047: Chen Qingyuan, et al.: 06 de Octubre, 2004**

En este trabajo se obtiene quitosano a partir de hongos con un peso molecular de 5000-140000 g/mol y grado de deacetilación de 85-95%.

- **Patente Europea: CN1548461: Wu Hanmin, et al.: 24 de Noviembre, 2004**

La presente invención relata la tecnología para la producción de quitosano. El proceso de producción de quitosano incluye los siguientes pasos: Remojar la quitina triturada en solución de hidróxido de sodio al 40-55% por 12-36 horas, se emplea un microondas para el calentamiento a 110-160°C por 0.5-1.5 horas, lavar con agua hasta neutralidad volver a adicionar una solución de hidróxido de sodio al 40-55%, calentar con microondas la muestra

- **Patente Europea US2004242537: Park Seung, et al.: 02 de Diciembre, 2004**

El presente trabajo relaciona un método para la acetilación de quitosano, el cual permite obtener un quitosano acetilado de un grado deseado de acetilación. El método comprende la producción de una solución de reactante crudo usando quitosano o oligosacáridos de quitosano producido por descomposición y deacetilación de la quitina como material crudo, y pasando la solución de reactante crudo a través de una línea de mezcla mientras secuencialmente se ajusta el pH con ácido acético en la línea de mezcla, así la solución de material crudo es sometido a la reacción de acetilación.

- **Patente Europea JP2004346267: Kosaka Yasuo, et al.: 09 de Diciembre, 2004**

Este método proporciona un método para la producción de quitosano de alta pureza.

Este proceso comprende los siguientes pasos: a) Disolución del polvo de quitosano en solución acuosa de ácido clorhídrico o sulfúrico, b) Desproteinización, c) Filtrado y microfiltrado, d) Separación del quitosano de las sales, de las cuales las sustancias con un peso molecular $\leq 1,000$ son separados y la fracción remanente es concentrada,

e) Ajuste en el pH, f) Filtración bajo presión reducida y microfiltración, g) Inspección del estándar de calidad; el producto después de pasar por inspección es esterilizado.

- **Patente Europea: CN1554267: Qin Caiqin, et al.: 15 de Diciembre, 2004**

Esta invención desarrolla un método para la obtención de quitosano soluble en agua, en el proceso se trata quitosano en una concentración de 28% en peso con una solución de ácido acético 2-10%, posteriormente se añade una encima o un oxidante para degradar al quitosano en su grado de polimerización debajo de 1000, enfriando la solución de 0-10°C, adicionando una solución de etanol o metanol en acético anhidro, agitando primero a una temperatura normal por 2-24 horas y después a 20-40°C adicionando álcali para regular el pH por encima de 8 después de la agitación, adicionando etanol, en seguida centrifugando el producto sólido obtenido, remojando en alcohol en solución de KOH, centrifugando, lavando el alcohol y secando el quitosano soluble en agua obtenido de grado de deacetilación de 45-55%.

- **Patente Europea: CN1563106: Jing Xiabin, et al.: 12 de Enero , 2005**

Este trabajo corresponde a un método para la obtención de quitosano de bajo peso molecular o soluble en agua usando radiación gamma en el proceso. En este proceso un quitosano de refinado peso molecular en estado sólido o en solución puede ser irradiado usando una fuente de ^{60}Co de rayos gamma y degradado, el producto degradado es sometido al posteriormente tratamientos de disolución y decoloración, etc. Así es obtenido el quitosano de bajo peso molecular o soluble en agua.

- **Patente Europea: JP2005029770: Okazaki Hideo, et al.: 03 de Febrero, 2005**

Esta invención desarrolla un método industrial no costoso para producir quitosano vegetal de alto rendimiento, el cual consiste en obtener quitosano vegetal empleando solución de álcali concentrado sobre basidiomicetos secos etc, siguiendo un calentamiento estos son convertidos en acetil glucosaminas de una quitina vegetal a partir de basidiomicetos, estas glucosaminas son obtenidas a través de la deacetilación, el álcali concentrado es neutralizado con un ácido orgánico o un ácido débil, de tal modo que se obtiene el quitosano vegetal por filtración y el proceso de tratamiento de lavado con agua.

- **Patente Europea: WO2005019272: Lamarque Guillaume, et al.: 03 de Marzo, 2005**

Esta invención relata un método para una menor deacetilación parcial de la quitina.

Este método comprende uno a más pasos que consisten en hervir la quitina suspendida en una solución de soda concentrada a una temperatura menor o igual a 100 °C por un periodo preferiblemente de 20 a 30 min. Este proceso debe de realizarse en un reactor a una presión reducida en ausencia de oxígeno. Así mismo debe de desarrollarse una serie de 6 reducidos ciclos de congelamiento/derretimiento, cada uno de los ciclos comprende los siguientes pasos: a) Sumergir el reactor en un enfriamiento medio antes que la reacción se congele completamente b) Adecuar las condiciones de tal manera que en el reactor la presión sea menor a la presión atmosférica c) Gradualmente calentar el reactor antes que la suspensión sea completamente congelada.

- **Patente Europea: CN1592756: Morten Varum , et al.: 09 de Marzo, 2005**

En este trabajo se mejora el proceso de preparación de quitosano. Así mismo se incluye el hinchamiento de partícula de la quitina con una solución acuosa por un periodo de 36 horas y posteriormente se trata con una solución alcalina a elevada temperatura produciéndose la deacetilación.

- **Patente Europea: JP2005068282: Ishikawa Hiroshi : 17 de Marzo, 2005**

Este trabajo desarrolla un método simple y no muy costoso para producir quitosano de fino tamaño de partícula el cual tiene propiedades de formar films, así como propiedades de cubrir la superficie de un sólido.

Par la obtención de quitosano de fino tamaño de partícula, se empleo una sal de ácido cítrico en solución acuosa la cual precipita al quitosano, por calentamiento se disuelve el quitosano precipitado por adición de la sal de ácido cítrico y finalmente se enfría la solución acuosa del quitosano precipitado.

- **Patente Europea: US2005159593: Struszczyk Henryk, et al.: 21 de Julio, 2005**

En este trabajo se desarrollo un método novedoso para la desproteinización del quitosano; las proteínas son disueltas en solución acuosa bajo agitación constante. El precipitado en forma de microcristales es sujeto a la acción de ácido o base en solución acuosa, las proteínas disueltas son removidas. El producto residual es quitosano desproteinizado⁽³²⁾.

3.2.3.- ESTRUCTURA CRISTALINA DEL QUITOSANO

Como en el caso de la quitina, las moléculas de quitosano en estado sólido también están organizadas en regiones ordenadas y cristalinas, y coexisten con regiones amorfas. La primera estructura cristalina documentada fue la propuesta por Clark y Smith para quitina de langosta sometida a deacetilación con NaOH a 95 °C. Dichos investigadores determinaron que la celda unidad era ortorrómbica y presentaba las siguientes dimensiones: $a= 0,89 \text{ nm}$, $b= 1,025 \text{ nm}$ y $c= 1,7 \text{ nm}$ y $\beta= 90^\circ$ ⁽³³⁾.

Con el paso de los años se identificaron distintas disposiciones polimórficas denominadas formas I y II. Ambas formas tienen celda unidad ortorrómbica.

Como pasaba con la quitina, el grado de cristalinidad y la estructura molecular son los factores claves para explicar la solubilidad, la tensión mecánica y otras propiedades funcionales del quitosano⁽³⁴⁾.

3.2.4.- SOLUBILIDAD DEL QUITOSANO

El quitosano, al ser una base, forma sales con ácidos y origina polielectrólitos cuyas solubilidades son función de la naturaleza del anión involucrado, del grado de deacetilación, del peso molecular del polímero y de la temperatura. Los quitosanos son solubles en diferentes medios.

Ácidos Inorgánicos: El quitosano es soluble en ácidos como el clorhídrico, el bromhídrico, el iodhídrico, el nítrico y el perclórico diluidos. Sin embargo, cuando se incrementan las concentraciones, se observa precipitación del quitosano. Es insoluble en ácido sulfúrico diluido y mejora su solubilidad al incrementar la concentración del ácido aunque, el proceso va acompañado de sulfatación y degradación del tamaño de la cadena ⁽³⁵⁾.

Ácidos Orgánicos: El quitosano forma sales solubles en ácidos orgánicos. Las sales de ácidos monocarboxílicos son solubles desde el fórmico hasta el hexanoico y los dicarboxílicos desde el propanodioico hasta el nonanodioico.

El comportamiento de sales de quitosano a partir de ácidos carboxílicos aromáticos, se encontró que el benzoato de quitosano es altamente soluble, mientras que el quitosano apenas se solubiliza en ácido benzoico.

Las sales de quitosano de los ácidos bencensulfónico, *p*-amino bencensulfónico y sulfosalicílico, metanosulfónico y butanosulfónico son solubles, mientras que la del ácido metanodisulfónico es insoluble.

Austin y Sennet prepararon sales de quitosano solubles en agua. Su procedimiento describe la dispersión del quitosano en medios orgánicos tales como tetrahidrofurano, acetato de etilo o 1,2- dicloroetano, añadiéndolos sobre ácidos carboxílicos como el ácido fórmico, el pirúvico y el láctico. Las preparaciones de perclorato y nitrato de quitosano se realizan añadiendo HClO₄ al 60% y HNO₃ al 70% a suspensiones de quitosano en ácido acético glacial ⁽³⁶⁾.

Solventes Orgánicos: El quitosano es insoluble en la gran mayoría de solventes orgánicos. Sin embargo Allan reporta que es soluble en dimetilformamida y en tetraóxido de dinitrógeno en una relación 3:1 (solvente/quitosano). Las soluciones resultantes presentan

baja viscosidad, no se provocan modificaciones químicas en el biopolímero considerando que el medio es lo suficientemente ácido como para permitir la esterificación con el anhídrido del ácido sin exigir la presencia de un catalizador. Este es el único solvente orgánico reportado para el quitosano ⁽³⁷⁾.

Solubilidad en Agua: Cuando la deacetilación de la quitina alcanza una proporción de 60% o mas de grupos amino con respecto a los amido, el producto obtenido sigue siendo insoluble en agua aunque, como ya se describió anteriormente, sea soluble en medio ácido por protonación de los grupos amino. Este hecho constituye la prueba practica para denominarlo quitosano.

3.2.5.- CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL QUITOSANO

Tanto la composición de las cadenas del quitosano, como sus dimensiones, suelen variar en dependencia del material de partida y de la rigurosidad del método de obtención. Por este motivo, el grado de deacetilación y la masa molecular son dos parámetros de obligatorio conocimiento para caracterizar una muestra de este polisacárido, ya que ambos tienen una gran incidencia en sus propiedades. Otras características, tales como la polidispersidad de la masa molecular, el contenido de humedad, la solubilidad y el porcentaje de cenizas son también de obligado conocimiento.

La caracterización fisicoquímica tanto de la quitina como del quitosano comprende la descripción del material de partida, el grado de deacetilación, peso molecular, solvente y propiedades de la solución.

Tanto la quitina como el quitosano se degradan antes de llegar a su punto de fusión. Esto es característico de carbohidratos con múltiples enlaces de hidrógeno. Los solventes que le confieren funcionalidad son distintos y depende de muchos factores como: concentración del polímero, pH de la solución, concentración del contra-ion y efecto de la temperatura en la viscosidad de la solución. Hasta el momento no están disponibles datos comparativos entre solventes. Como regla general, la máxima cantidad de polímero se disuelve en una solución homogénea, posteriormente el polímero se regenera en la forma requerida (fibras, polvo, etc.). El quitosano se disuelve en todos los ácidos minerales ⁽³⁸⁾.

Estructuralmente, el quitosano, sea de origen de α - ó β -quitina, se caracteriza mediante su

grado de deacetilación y su peso molecular. El grado de deacetilación es la relación entre el número de monómeros de glucosamina y el número de monómeros de *N*-acetilglucosamina en la cadena del polímero. Esta propiedad determina si el producto es quitina o quitosano, si el grado de deacetilación o DD -sus siglas en inglés- es 40 entonces se considera como quitosano. El grado de deacetilación influye en las propiedades físicas, químicas y biológicas del quitosano, tales como la fuerza tensil de los films, habilidad para quelar iones y la actividad inmunológica. Por otro lado, la determinación del peso molecular del quitosano, se realiza por métodos empíricos como la viscosimetría y absolutos como el uso de la técnica de dispersión de la luz, influye también en las propiedades de los films y los hidrogeles, por ejemplo, quitosanos de alto peso molecular construirán mallas mucho más densas que disminuyen la velocidad de la liberación de drogas, aumentan la biocompatibilidad en la piel, mayor adhesión al tejido epitelial, films más resistentes, etc.

A continuación se discuten y se describen los principales métodos empleados para caracterizar estos biopolímeros:

a) Métodos para la Determinación del Peso Molecular

Los polímeros se caracterizan porque son macromoléculas con una alta distribución del peso molecular, es decir no poseen un peso molecular exacto. Los métodos utilizados para determinar el peso molecular de la quitina y el quitosano son los empleados para ese fin en cualquier compuesto macromolecular: la viscosimetría, la dispersión de la luz y la cromatografía de permeación de gel⁽³⁹⁾.

Viscosimetría; Es el método más utilizado para obtener el peso molecular del quitosano. El método tiene la desventaja de no ser una técnica absoluta, por lo que requiere la determinación de las constantes mediante la correlación de valores de viscosidad intrínseca con valores de pesos moleculares medidos por un método absoluto. La determinación del peso molecular por viscosidad se realiza fácilmente midiendo la viscosidad intrínseca del polímero. La viscosidad intrínseca es la intersección de una gráfica viscosidad específica versus concentración, en un determinado solvente y aplicando la fórmula:

$$[\eta] = KM \bar{v}^a \dots\dots\dots (2)$$

En esta ecuación (relación de Mark-Houwink-Sakurada), M_v es el peso molecular promedio viscosimétrico y K y a son dos constantes que dependen de la naturaleza del polímero, del sistema disolvente utilizado y de la temperatura. Particularmente, en el caso del quitosano la extensión del grado de N-acetilación y la polidispersidad respecto del contenido de residuos N-acetilo deben controlarse durante la calibración por su influencia sobre el comportamiento reológico de la disolución. También debe tenerse en cuenta la tendencia del quitosano a formar agregados, que hace necesario clarificar cuidadosamente las soluciones por filtración y/o centrifugación⁽⁴⁰⁾.

Dispersión de Luz; Este es un método absoluto para determinar el Peso Molecular, donde se mide la intensidad de la luz dispersada por una solución del polímero en función del ángulo de dispersión (θ) y la concentración, la intensidad de la luz dispersada es inversamente proporcional al peso molecular. Sin embargo esta técnica es dificultosa y a veces se presentan datos difíciles de interpretar cuando se presenta agregación y/o asociación molecular.

Cromatografía de permeación en gel (GPC); Permite no solamente determinar el peso molecular sino, también, la distribución de pesos moleculares del polímero. El método consiste en hacer pasar una disolución diluida del polímero a través de una columna rellena de un gel rígido poroso. Las moléculas del polímero de la disolución se difunden a través de la estructura porosa del gel en una extensión que depende de su tamaño. Las moléculas más grandes penetran poco o nada en los poros del gel y fluyen más rápido, mientras que las pequeñas realizan un recorrido mayor a través de la estructura porosa del relleno y se retrasan en su avance por la columna. Se produce, de esta manera, una separación en términos de sus tamaños moleculares o, de modo más correcto, respecto a sus volúmenes hidrodinámicos.

b) Métodos para Determinar el Grado de Deacetilación

Se han desarrollado numerosos métodos para determinar el grado de N-acetilación del quitosano basados en diversas técnicas. Entre estas técnicas, podemos destacar la espectroscopia de Infrarrojo, la espectroscopia de UV, la espectroscopia de RMN, la Potenciometría, Titulación Metacromática, Determinación Enzimática y la conductimetría.

Otras técnicas alternativas incluyen el análisis elemental, el análisis térmico, la cromatografía de HPLC y el dicroísmo circular. Sin embargo no todos los métodos son adecuados para todo el rango de 0-100%. Se considera que, el resultado del análisis por RMN en estado sólido (^{13}C -CPMAS NMR) es el más confiable.

Los métodos en donde se cuantifica directamente al grupo amino, son preferidos para la determinación del grado de deacetilación. El método de la primera derivada en espectroscopía ultravioleta desarrollada por Muzzarelli y Rochetti (1985) es razonablemente independiente a la contaminación por proteínas (la cual constituye la mayor interferencia en todos los métodos) es además un método sencillo en cuanto a instrumentación y reactivos, ha sido mejorada por Tan et. al (1998) utilizando una curva de corrección del efecto de la glucosamina en la curva de calibración de *N*-acetilglucosamina que describe Muzzarelli, para el análisis de quitosanos 89 - 100 % DD ⁽⁴¹⁾.

Espectroscopía infrarroja; Debido a su simplicidad, este es uno de los métodos más empleados. Las muestras se pueden preparar para su análisis en forma de películas o en pastillas de KBr.

En la Figura 14, se muestra el espectro FTIR de una quitosano con un 30% de Nacetilación. Se pueden apreciar las bandas características en un espectro de IR típicos a $3\,450\text{ cm}^{-1}$ (grupo -OH), a $3\,292\text{ cm}^{-1}$ (grupo N-H), a $2\,919$ y $2\,862\text{ cm}^{-1}$ (grupo C-H), a $1\,655\text{ cm}^{-1}$ (amida I), a $1\,580\text{ cm}^{-1}$ (doblaje del grupo -NH₂), a $1\,313\text{ cm}^{-1}$ (amida III), a $1\,154\text{ cm}^{-1}$ (tensión antisimétrica del puente C-O-C), a $1\,082$ y $1\,032\text{ cm}^{-1}$ (vibraciones del esqueleto propias de su estructura piranósica) y a 896 cm^{-1} (tensión C-H de los grupos anoméricos).

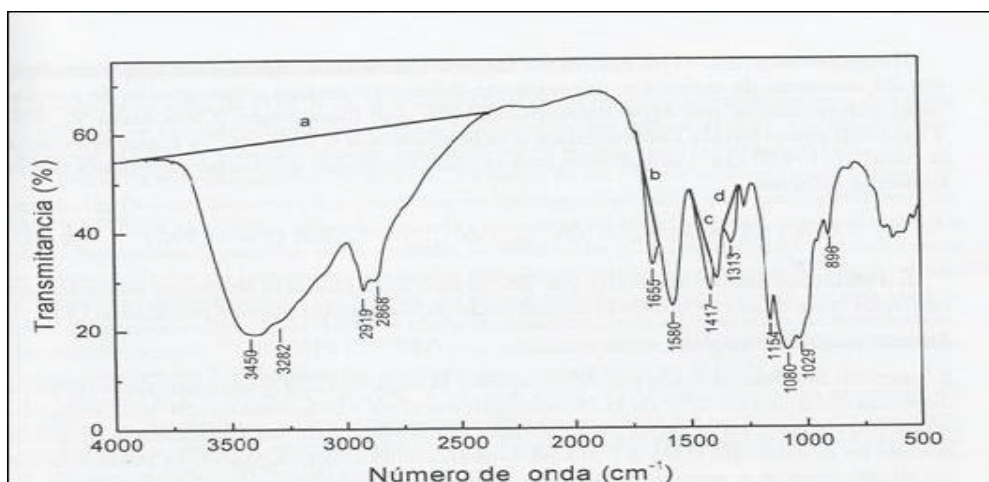


Fig. 14 Espectro FTIR de una muestra de Quitosano.

Las líneas a y b son las utilizadas por Baxter (ecuación 3), las líneas c y d son las utilizadas por Brugnerotto (ecuación 4) ^(42,43).

El método de IR consiste en correlacionar la relación de absorbancias entre dos bandas de absorción determinadas, con el tanto por ciento de acetilación del quitosano. La selección de las bandas de absorción involucra una señal que depende del grado de N-acetilación - normalmente, una de las bandas amida- y otra que sirve de referencia interna para corregir las diferencias de grosor de las películas o de concentración en las pastillas de KBr. Por ejemplo, en el método de Baxter, el grado de N-acetilación se calcula por la siguiente ecuación:

$$DA = (A_{1655}/A_{3450}) \times 115 \quad (3)$$

Donde A_{1655} y A_{3450} son las absorbancias correspondientes, respectivamente, a la amida y a la referencia.

Brugnerotto realizó una extensiva investigación en la que se analizaron 25 muestras de quitina y quitosano de diferentes fuentes y con grados de acetilación, determinados por espectroscopía RMN, que iban desde 0,5% hasta 97,9%. Tomando como banda característica a la localizada a 1320 cm^{-1} , y como referencia la banda a 1420 cm^{-1} , obtuvieron una correlación lineal que viene expresada por la siguiente ecuación:

$$DA(\%) = 31.92 \times (A_{1320}/A_{1420}) - 12.20 ; (r= 0.990) \quad (4)$$

En todas las determinaciones por IR, es muy importante la selección adecuada de la línea base en el cálculo de la absorbancia para alcanzar buenos resultados.

Espectroscopía ultravioleta

El método fue desarrollado por Muzzarelli y Rocchetti y hace uso de la primera derivada del espectro UV de la N-acetilglucosamina y el quitosano. Se basa en la observación de que, en el espectro UV-primer derivada de las disoluciones de ácido acético en el intervalo 0,01 a 0,03 M, registradas contra agua, es posible notar un punto común a aproximadamente 199 nm designado como punto de cruce cero. El punto de cruce cero se corresponde con el máximo de la N-acetilglucosamina. Esto hecho origina que la determinación de N-acetilglucosamina sea independiente de la concentración de ácido acético usualmente empleada en las soluciones diluidas de quitosano⁽⁴⁴⁾.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

La espectroscopía de RMN de alta resolución es un método no invasivo muy útil para el estudio de las estructuras químicas y estéricas de los polisacáridos.

Tanto la espectroscopía RMN de ^1H como la de ^{13}C se utilizan para estimar el grado de N acetilación de las muestras de quitosano en solución. La espectroscopia de ^{13}C -RMN se utiliza, además, para las muestras en estado sólido, aunque necesita de aditamentos especiales para mejorar la resolución y la sensibilidad tales como un desacoplador de protón de alto poder para la polarización cruzada (CP), un desacoplador protón-dipolar (DD) y un accesorio de rotación de muestra de alta velocidad de ángulo mágico (MAS). Para las muestras con altos grados de acetilación, la espectroscopia ^{13}C -RMN CP/MAS es más adecuada, ya que tales muestras son poco solubles en los disolventes comúnmente empleados en RMN.

Usando CP/MAS ^{13}C -RMN, Pelletier determinó el grado de acetilación de quitinas y quitosanos comparando las áreas de las señales de resonancia del grupo metilo a aproximadamente 23 ppm con las resonancias de los carbonos glicosídicos entre 58 y 100 ppm.

Para la determinación en solución, es preferible despolimerizar parcialmente la muestra, ya que, de esta forma, aumenta su solubilidad y disminuye la viscosidad, lo que permite

obtener un espectro RMN de alta calidad y con señales de menor amplitud como se observa en la figura 15, donde se observa serie de soluciones de quitosano (F_A = fracción molar de las unidades *N*-acetiladas de quitosano). Se observa la señal de HOD generado por el solvente y residuos de agua⁽⁴⁵⁾.

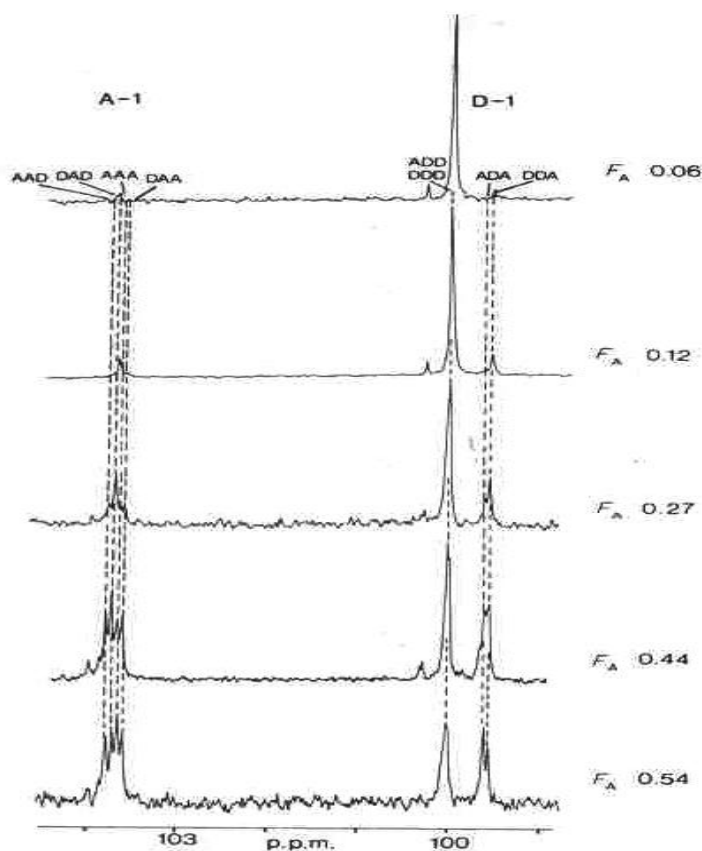


Fig. 15 Espectros de ^1H - RMN y ^{13}C - RMN del quitosano.

Espectro ^1H - RMN (500 MHz) de una solución de quitosano (10 mg/mL) en D_2O (a pD 3 y 90 °C).

Valoración potenciométrica

La determinación potenciométrica del grado de N-acetilación del quitosano se realiza, usualmente, por los métodos descritos por Broussignac y Muzzarelli. Se trata de disolver el quitosano en un exceso conocido de HCl. La solución de quitosano se valora, entonces, con una solución de NaOH y se usa un pH-metro equipado con un electrodo de vidrio. Se obtiene, así, una curva de pH frente al volumen de NaOH añadido, curva que presenta dos puntos de inflexión. La diferencia de volumen entre estos dos puntos se corresponde con el ácido consumido para la protonación de los grupos amino y permite la determinación del grado de acetilación del quitosano⁽⁴⁶⁾.

Valoración Conductimétrica

Se basa en la elevada conductancia que presentan los iones hidrógeno e hidroxilo en comparación con otros. Nuevamente una solución de quitosano en exceso de HCl se valora con una solución de NaOH, se usa, en este caso, un conductímetro. La neutralización del exceso de ácido se manifiesta con una disminución casi lineal de la conductividad de la solución hasta llegar a un valor mínimo. A continuación se produce un incremento de la conductividad debido a la neutralización de los grupos amino protonados del quitosano. Esta curva presenta cierta curvatura motivada por la precipitación del quitosano que comienza a pH = 6.5. Cuando la neutralización se completa, la curva ascendente adquiere una mayor pendiente debido al exceso de álcali añadido⁽⁴⁷⁾.

Existen métodos estandarizados para caracterizar al quitosano. Diferentes fuentes que detallan los métodos que se han empezado a adoptar por organizaciones internacionales como, por ejemplo, la European Pharmacopoeia, la ASTM. A la fecha, esta última organización ya ha emitido los siguientes documentos:

- F21 03-0 1: Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Product Applications
- 2260-03: Standard Test Method for Determining Degree of Deacetylation in Chitosan Salts by Proton Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR) Spectroscopy
- WK96S: Standard Test Method for the Determination of the Molecular Weight of

Chitosan and Chitosan Salts by Size Exclusion Chromatography with Multi-Angle Light Scattering Detection (SEC-MALS)⁽⁴⁸⁾.

3.2.6.- REACTIVIDAD DEL QUITOSANO

El quitosano es soluble en ácidos diluidos y puede formar sales, como por ejemplo el cloruro de quitosano al disolverse con el ácido HCl en ebullición y luego precipitar, al neutralizarse la solución se coagula el producto.

En el quitosano, el grupo amino del C2 es más reactivo contra los electrófilos que el grupo hidroxilo del C3 y C6 en el residuo del quitosano. Sin embargo, dependiendo de las condiciones de la reacción (pH, solvente, temperatura) la reacción toma lugar ya sea en el grupo amino del C2 o grupo hidroxilo del C6; así se da que a pH neutro o ácido es predominante en la primera posición, y a pH alcalino en la segunda. Por ello los derivados del quitosano se encuentran modificados en esas posiciones, de tal manera que se obtienen nuevos derivados que modulan las propiedades del quitosano en cuanto a solubilidad, características fisicoquímicas y actividad biológica⁽⁴⁹⁾.

a) Acilación

N-acilación; En general, la acetilación del quitosano con anhídridos carboxílicos o cloruros de acilos se produce, preferentemente, en los grupos amino libre; la reacción con los grupos hidroxilo es más lenta. Como muestra la Figura 16, los grupos amino libres del quitosano pueden ser acilados con anhídridos o haluros de acilo para dar lugar a derivados como el nonanoilo, hexanoilo, dodecanoilo, benzoilo, lauroilo y tetradecanoilo, entre otros. Una acilación intensiva de grupos amino e hidroxilos puede dar lugar a productos solubles en solventes orgánicos como el cloroformo.

Por lo general, la acilación del quitosano se lleva a cabo en una mezcla de solución acuosa de ácido acético diluido con metanol. Al inicio, la reacción es homogénea conforme avanza, el producto precipita o forma un gel debido a su menor solubilidad. Esta reacción no es del todo selectiva y en algunos casos se produce *o*-acilación además de la reacción del grupo amina libre⁽⁵⁰⁾.

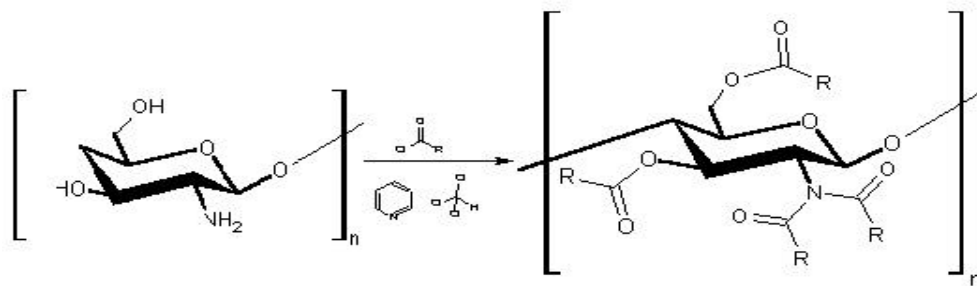


Fig. 16 Acilación de quitosano con cloruro de acilo

O-acilación; La reacción del quitosano en exceso de cloruros de hexanoilo, decanoilo o dodecanoilo en una mezcla de piridina y cloroformo secos forma derivados totalmente acilados ⁽⁵¹⁾.

b) N-Ftaloilación

Una manera de proteger los grupos aminos libres del quitosano es haciéndolos reaccionar con anhídrido ftálico. Luego de las derivatizaciones deseadas, los grupos ftaloilo se eliminan fácilmente con hidracina; ello regenera las aminos libres del quitosano. Para la ftaloilación, generalmente, se forma primero el gel hinchado a partir de una solución acuosa de quitina soluble y un solvente orgánico como piridina o dimetilacetamida (DMAc). La reacción del gel con anhídridos ftálicos, trimelítico o piromelítico forma el derivado N-acilado que, por deshidratación posterior, produce el derivado imida. De estos productos, únicamente el derivado ftaloilo es soluble en dimetilsulfóxido (DMSO), lo que lo hace un intermediario interesante para subsiguientes modificaciones ⁽⁵²⁾.

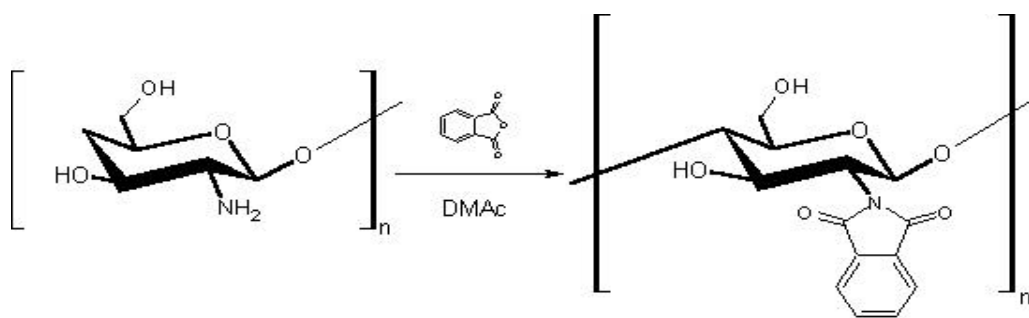


Fig. 17 Ftaloilación del quitosano

c) Formación de Bases de Schiff

La amina primaria presente en el quitosano reacciona con aldehídos y cetonas para formar bases de Schiff. Por lo general, se añade el aldehído a una solución de quitosano en una mezcla de ácido acético y metanol. La reacción se verifica por la gelación del sistema debido a la reducida solubilidad del producto en agua. El grupo imino formado es estable en medios neutros y alcalinos, pero se hidroliza rápidamente en medios ácidos y regenera la amina libre ⁽⁵³⁾.

d) Carboximetilación

La quitina alcalina forma derivados carboximetilados por reacción con ácido monocloroacético. La reacción ocurre mayoritariamente en el carbono C-6, pero también puede reaccionar el nitrógeno si este se encuentra como amina libre. Bajo estas condiciones, generalmente, el producto también es deacetilado y resulta un derivado anfotérico. Por otro lado los derivados N-carboximetilados de quitosano se pueden obtener selectivamente por alquilación reductiva.

Se han preparado distintos derivados carboximetilados de quitina solubles, como la 6-*O*-carboximetilquitina, 3-*O*-carboximetilquitina, *O*-carboximetilquitosano, *N*-carboximetilquitosano, *N*-dicarboximetilquitosano y *N,O*-carboximetilquitosano. Estos derivados han sido estudiados para distintos usos como por ejemplo: vendas para heridas, geles para cosmética, excipientes en formulaciones ópticas, suturas quirúrgicas, preparación de microcápsulas para la liberación controlada de drogas, en la agricultura como films para

protección de frutos y como agentes de acomplejación de iones metálicos en aguas de desecho industrial⁽⁵⁴⁾.

N,O-carboximetilquitosano; El N,O-carboximetilquitosano es un derivado soluble en agua que contiene dos grupos carboximetilo y posee carga negativa que lo hace soluble en condiciones ligeramente básicas tales como el pH fisiológico.

3.2.7.- APLICACIONES DEL QUITOSANO

La presencia de grupos aminos en la cadena polimérica ha hecho del quitosano uno de los materiales mas versátiles, por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones, tales como la reacción de anclaje de enzimas, reacciones de injerto, obtención de películas entrecruzadas, etc, de las cuales se obtienen materiales con propiedades adecuadas para aplicaciones inmediatas y futuras en biotecnología, biomedicina, agricultura, etc.

a) Aplicaciones Biomédicas

Whisteler⁽⁵⁵⁾ y Yalpani⁽⁵⁶⁾, sugieren que los quitosanos pueden ser usados para inhibir fibroplasias y promover el crecimiento de tejidos.

El quitosano es un polímetro lineal de propiedades catiónicas que, a pH de alrededor de 6.5, mantiene una carga positiva. Entre las propiedades del quitosano asociadas a su carácter de polímero catiónico, podemos reconocer las siguientes: es un polielectrolito lineal con alta densidad de carga positiva con capacidad para adherirse a materiales cargados negativamente y, por esto ultimo, convertirse en un excelente floculante; se enlaza con superficies celulares y resulta eficiente para el cuidado de la piel y el cabello; y forma geles ionotrópicos con polianiones como el polifosfato o el alginato y tiene capacidad de formar membranas sobre ellos.

Las más importantes de estas propiedades biológicas son las siguientes: la biocompatibilidad, el hecho de ser biodegradable, que permitirá que los productos de su degradación como la glucosamina o la N-acetilglucosamina se dispersen en el organismo que lo usa; el efecto regenerativo sobre el tejido conjuntivo; y el hecho de acelerar la formación de osteoblastos responsables de la formación de hueso. Sandford y Steiner

reportan, además, las siguientes propiedades biológicas para los quitosanos: hemostática, bacteriostática, fungistática, espermicida, antitumoral, anticolesterolémica, inmunoadyuvante y sedante del sistema nervioso central⁽⁵⁷⁾.

Actualmente, se usan en vendajes para heridas, alimentos dietéticos anticolesterolémicos, vehículos para la liberación controlada de fármacos, entre otras aplicaciones.

La tabla 3 presenta los roles biológicos de los quitosanos y en la tabla 4 se muestran las formas físicas de derivados de quitina y sus aplicaciones biomédicas.

Tabla 3.- Roles Biológicos de quitosanos aplicados a tejidos humanos ⁽⁵⁸⁾.

Propiedades
<ol style="list-style-type: none"> 1) Ordenar la reconstrucción de tejidos conectivos <ul style="list-style-type: none"> • Osteoinducción • Curación de lesiones en meniscos • Curación de úlceras y heridas. 2) Inmunestimulación 3) Estimulación de la migración de estromas 4) Biodegradabilidad enzimática 5) Mucoadhesión 6) Actividad antimicrobiana: <ul style="list-style-type: none"> • Formación de complejos polielectrolitos • Quelación de metales de metaloenzimas • Inhibición de enzimas ligadas a la quitina • Alteración de la adhesión bacteriana. 7) Importancia Dietaria <ul style="list-style-type: none"> • Actividad anticolesterolémica • Agente antiúlceras • Control de sobrepeso

Tabla 4.- Formas físicas de derivados de quitina y sus aplicaciones biomédicas ⁽⁵⁹⁾

Forma del material	Aplicación
1. Soluciones	<ul style="list-style-type: none"> • Agente bacteriostático • Agente hemostático • Cosmética
2. Geles	<ul style="list-style-type: none"> • Vehículo para el transporte de fármacos • Espermicida
3. Polvos	<ul style="list-style-type: none"> • Talcos para guantes de cirugía • Inmovilización de enzimas
4. Membranas/Películas	<ul style="list-style-type: none"> • Membranas de diálisis • Lentes de contacto
5. Parches	<ul style="list-style-type: none"> • Agentes hemostáticos para mucosas • Vendas
6. Diversas formas farmacéuticas	<ul style="list-style-type: none"> • Materiales antiolesterolémicos • Agente antigastroitis • Anticoagulantes

b) Aplicaciones Farmacéuticas:

En las últimas décadas, se ha investigado el uso de quitosano en sistemas de liberación controlada de fármacos. Este biopolímero catiónico con grupos funcionales potencialmente reactivos tiene posibilidades especiales para utilizarse en esta tecnología. La biocompatibilidad y la biodegradabilidad del quitosano han sido claramente establecidas y son cualidades sumamente importantes para esos objetivos. Los quitosanos pueden ser usados en sistemas microgranulados asociados a otras matrices de liberación, en geles de liberación controlada o como vehículos de liberación en granulación húmeda ⁽⁶⁰⁾.

c) Aplicaciones en agricultura

El uso de quitina y quitosano en la agricultura se centra en mejorar los rendimientos agronómicos por medio de varios mecanismos. Las semillas recubiertas con soluciones de quitosano mejoran su germinación y producen altos rendimientos en la cosecha.

La actividad antimicrobiana del quitosano se emplea para proteger a estos productos y proporcionarles una cobertura generada por la propiedad filmogénica de las soluciones del quitosano tras un proceso de secado por evaporación del solvente.

Otro campo de aplicación de la quitina y los quitosanos en agricultura es su utilización como matrices para la liberación de agroquímicos para el control de plagas o para suministrar nutrientes de una manera sostenida y selectiva ⁽⁶¹⁾.

d) Aplicación en tratamiento de Aguas

El quitosano cargado positivamente tiene la habilidad de combinarse con moléculas con cargas negativas. La eficiencia de este proceso depende básicamente del pH.

La quitina y el quitosano son usados para decolorar aguas residuales aprovechando la alta afinidad de estos polímeros con colorantes de diversos tipos.

La quitina y quitosano pueden usarse para remover efluentes con contenidos del orden de 10 a 50 ppm de metales como mercurio, cadmio, plomo y cobre. La eficiencia de este último proceso dependerá de condiciones como la concentración, la temperatura, el tamaño de partícula de la muestra y la calidad y la cantidad del biopolímero usado.

e) Aplicaciones en cosmética

La actividad funguicida del quitosano y la capacidad para disolverse en ácidos orgánicos lo hace compatible en formulaciones de cremas, lociones y acondicionadores para el cabello. Entre los efectos positivos de los quitosanos en formulaciones cosméticas, tenemos su compatibilidad con la piel, a la que protege actuando como una barrera física contra la radiación ultravioleta y la deshidratación. Su formulación en cremas aprovecha su carácter filmogénico, que permite una rápida disminución de las líneas de expresión.

Debido a las propiedades de cristalinidad del quitosano, sumadas a sus características antimicrobianas, biodegradabilidad y capacidad de formar películas, ha sido propuesto como material alternativo para lentes de contacto ⁽⁶²⁾.

3.3.- HIDROGELES

Las matrices poliméricas hinchadas con agua o hidrogeles son sistemas que incrementan su volumen hasta alcanzar el equilibrio fisicoquímico, en respuesta a diferentes tipos de estímulos como la luz, fuerza iónica, temperatura, pH, campo eléctrico o concentración del disolvente.

Los hidrogeles forman una clase específica de biomateriales poliméricos entrecruzados en forma de red tridimensional que tienen la capacidad de absorber una gran cantidad de agua formando materiales blandos y elásticos. Dependiendo de las propiedades del polímero usado como son naturaleza y densidad de las uniones de la red, como estructuras en un equilibrio pueden contener diferentes cantidades de agua, comúnmente en el estado de hinchamiento la fracción de masa del agua en el hidrogel es mucha mas alta que la fracción de masa del polímero. Dos clases de hidrogeles son definidos: físicos (pseudogeles), donde las cadenas son conectadas por fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrogeno, interacciones hidrofóbicas o cadenas desordenadas (como gel no son permanentes y usualmente estas pueden convertirse en solución por calentamiento) y química (verdaderamente permanente) hidrogeles con enlaces covalentes ligados en la cadena ⁽⁶³⁾.

Generalmente materiales simples que se emplean para este propósito son: poli(etilen oxido) PEO, poli(vinil alcohol) PVA, polivinilpirrolidina PVP, poliacrilamida PAAM, poli(acril ácido) PAA, poli(vinil metil éter) PVME. Algunos otros polímeros usados son los derivados de polisacáridos.

El poli(vinil alcohol) es uno de los polímeros mas ampliamente usados por sus excelentes propiedades mecánicas, así mismo este polímero es biodegradable bajo condiciones establecidas. El PVA comercial es una mezcla de estructuras de PVA (isotácticos, sindiotáctico y atáctico), estas estructuras y las propiedades físicas y químicas son fuertemente dependientes de los métodos de preparación usados. La solubilidad del PVA en agua depende del grado de hidrólisis y polimerización. Generalmente PVA con hidrólisis de 98.5% o mas alta puede ser disuelto en agua a 70 °C ⁽⁶⁴⁾.

3.3.1.1.- OBTENCIÓN DE LOS HIDROGELES

Los hidrogeles pueden ser sintetizados por caminos químicos clásicos, el cual incluye uno de estos procedimientos como polimerización y entrecruzamiento paralelo de monómeros multifuncionales, así mismo pueden incluir varios pasos que involucran síntesis de moléculas de polímeros que tienen grupos reactivos y su subsecuente entrecruzamiento, posiblemente también por reacción de polímeros con un conveniente agente de entrecruzamiento.

El hinchamiento, de los hidrogeles preparados por el entrecruzamiento de una sola especie de polielectrolito (un policación o un polianión) son generalmente muy sensibles al pH del medio. Por lo general, los hidrogeles preparados con quitosano logran un grado de hinchamiento máximo a valores de pH ácidos bien determinados, debido a que el máximo grado de hinchamiento de estos materiales surge de un compromiso entre la máxima repulsión que pueden experimentar los grupos cargados y el mínimo apantallamiento que genera la adición de un exceso del ácido. En el caso de los complejos polielectrólitos, entrecruzados químicamente en reacciones posteriores, es posible obtener materiales que se hinchen tanto a pH ácido como a pH básico⁽⁶⁵⁾.

La gran mayoría de las investigaciones en el área de los hidrogeles se ubican dentro de tres categorías: síntesis y caracterización del gel, modelamiento teórico del hinchamiento teórico y aplicaciones. El desarrollo de estos materiales comenzó en 1960, cuando Wichterle y Lim publicaron los resultados obtenidos en aplicaciones biomédicas con hidrogeles de poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) y sus derivados⁽⁶⁶⁾. Actualmente, los hidrogeles son ampliamente utilizados gracias a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, naturaleza inerte, buenas propiedades mecánicas, y resistencia química y térmica, siendo particularmente útil para la liberación controlada de productos farmacéuticos y fertilizantes agrícolas.

3.3.1.2.- *ENTRECruzAMIENTO QUÍMICO DE LOS GELES*

a) Entrecruzamiento por radical de polimerización

El entrecruzamiento químico de los geles puede ser obtenido por radicales de polimerización monoméricos de bajo peso molecular en presencia de agentes de entrecruzamiento. El Poli(2-hidroxietil metacrilato) (pHEMA) es uno de los mas conocidos y frecuentemente estudiado en sistemas de hidrogeles.

El primer hidrogel fue descrito por Wichterle y Lim, este fue obtenido por polimerización de HEMA en presencia de un agente de entrecruzamiento (por ejemplo: etilen glicol dimetacrilato).

Un incremento en la sensibilidad del material puede ser obtenido por la adición de ácido metacrílico (geles sensibles al pH) o *N*-isopropilacrilamida (geles sensibles a la temperatura), entre otros. Junto con el radical de polimerización de las mezclas de monómeros vinílicos, el entrecruzamiento químico de los hidrogeles puede ser obtenido por el radical de polimerización de polímeros solubles en agua con grupos polimerizables, diferentes polímeros solubles en agua (sintéticos, semisintéticos y naturales) pueden ser usados para la obtención de hidrogeles por esta ruta⁽⁶⁷⁾.

b) Entrecruzamiento por reacciones químicas de grupos complementarios

Polímeros solubles en agua con propiedades de solubilidad en presencia de grupos funcionales como OH, COOH, NH₂ pueden ser usados para la obtención de hidrogeles. Enlaces covalentes entre las cadenas del polímero pueden ser establecidas por la reacción de grupos funcionales con reactividad complementaria como una reacción amina-ácido carboxílico, isocianato-OH/NH₂ o por la formación de bases de Schiff.

- **Entrecruzamiento empleando aldehídos:** Polímeros solubles en agua con grupos hidroxilicos (por ejemplo alcohol poli vinílico) puede ser entrecruzado usando glutaraldehído. Para establecer el entrecruzamiento deben de emplearse condiciones drásticas. En contraste los polímeros que contienen amina para su entrecruzamiento emplean los mismos reactivos descritos anteriormente pero emplean condiciones menos drásticas y se forman bases de Schiff. Esto es especialmente investigado para la preparación de entrecruzamiento de proteínas.

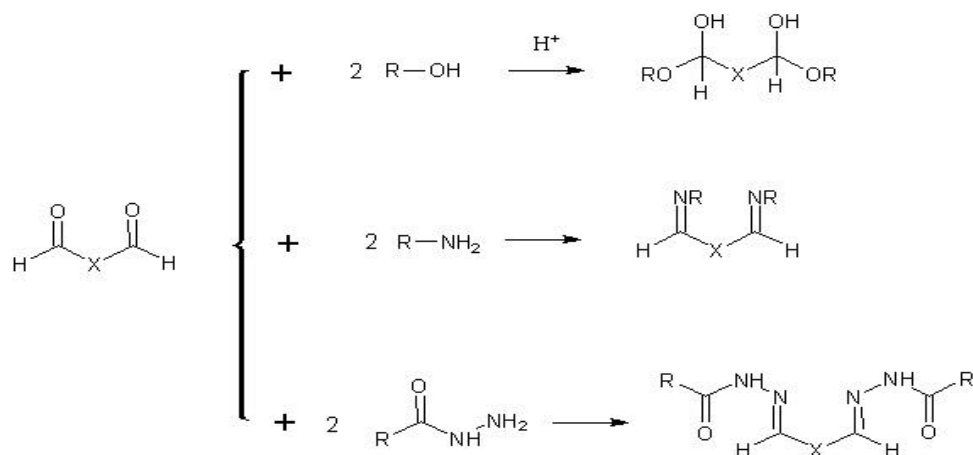


Fig. 18 Aldehído-mediador del entrecruzamiento de polímeros que contienen alcohol, amina o grupos hidrácidos (R representa la cadena del polímero, X es cualquier grupo por ejemplo (CH₂)₃ en el caso de glutaraldehído)

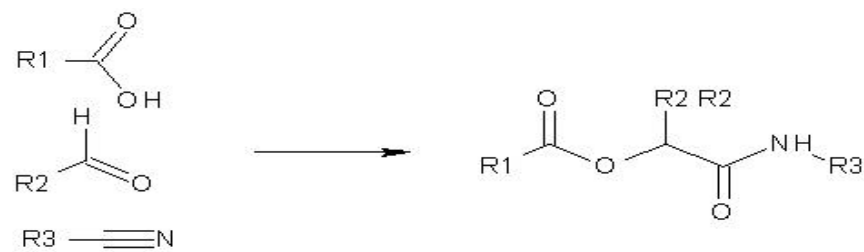
- Entrecruzamiento por reacciones de adición:** Polímeros solubles en agua pueden ser convertidos en hidrogeles usando una o alta cantidad de agentes de entrecruzamiento los cuales reaccionan con grupos funcionales de polímeros solubles en agua vía reacciones por adición. Polisacáridos pueden entrecruzarse empleando 1,6-hexametilendiisocianato, divinilsulfona o 1,6-dibromohexano entre otros reactivos. Las reacciones de entrecruzamiento son preferiblemente llevadas a cabo en solventes orgánicos debido a que el agua puede reaccionar con el agente de entrecruzamiento; así mismo los agentes de entrecruzamiento son generalmente tóxicos, por lo tanto se extrae rigurosamente para eliminar las trazas del material no reactante.
- Entrecruzamiento por reacciones de condensación:** Las reacciones de condensación entre el grupo hidroxilo y las aminas con ácidos carboxílicos o derivados de estos son frecuentemente usados para síntesis de polímeros como poliésteres y poliamidas respectivamente. Estas reacciones pueden ser usadas para la obtención de hidrogeles, una reactivo de buena eficiencia para el

entrecruzamiento de polímeros solubles en agua con enlaces amídicos es *N,N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etil carbodimida (EDC) entre otros.

La síntesis de hidrogeles de polisacáridos se puede llevar a cabo empleando las reacciones de condensación de Passerini y Ugi ⁽⁶⁸⁾.

En la reacción de Passerini el ácido carboxílico y el aldehído o el grupo cetónico son condensados con isocianida para producir α (acriloxi) amida. En la reacción de condensación de Ugi una amina es adicionada a la reacción para producir α (acrilamino) amida, la reacción puede ser llevada a cabo en medio acuoso a pH ligeramente ácido y a temperatura ambiente.

Passerini



Ugi

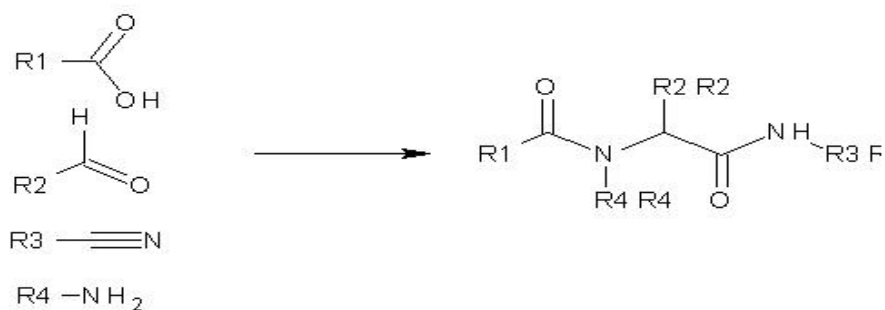


Fig. 19 Reacciones de Condensación de Passerini y Ugi.

c) Entrecruzamiento por alta energía de irradiación

Una alta energía de irradiación (gamma o electrón beam) puede ser usada para polimerizar compuestos insaturados. Esto implica que polímeros solubles en agua derivatizados con grupos vinílicos pueden ser convertidos en hidrogeles usando una alta energía de

irradiación. Hidrogeles pueden ser obtenidos por irradiación inducida que promueve la polimerización de una mezcla de acrilatos monofuncionales (por ejemplo: acrilato-prolina metil ester).

Por otro lado una alta energía de irradiación es capaz del entrecruzamiento de polímeros solubles en agua sin grupos vinilos adicionales. Durante la irradiación (gamma o electrón beam) de soluciones acuosas de polímeros, pueden formarse radicales de la cadena del polímero por ejemplo: la ruptura homolítica de los enlaces C-H así como la radiólisis del agua, da lugar a la formación de radicales hidroxil los cuales atacan a la cadena del polímero dando lugar a la formación de macroradicales.

La recombinación de macroradicales en cadenas diferentes dan lugar a la formación de enlaces covalentes y finalmente a la estructura de entrecruzamiento. Estos macroradicales pueden reaccionar con el oxígeno.

El alcohol polivinílico, polietilenglicol y ácido poliacrílico son ejemplos conocidos de polímeros que pueden ser entrecruzados con una alta energía de irradiación.

Las propiedades de los geles formados, en particular su grado de hinchamiento y sus características de permeabilidad dependen de la concentración del polímero y de las dosis de irradiación; en general la densidad de entrecruzamiento incrementa con el incremento de la concentración del polímero y la dosis de radiación. Un gel termosensible puede ser obtenido por irradiación en solución acuosa de poli(metil vinil éter).

La irradiación de soluciones diluidas de polímeros sobre la fase de transición de temperatura, produce micropartículas de polímeros con diámetros de 300 a 500 nm. Hidrogeles basados en Poli(aminoácidos) fueron recientemente estudiados y fueron obtenidos por irradiación gamma en solución acuosa de polipentapéptidos, estos fueron considerados como GVGVP (G= glicina, V= valina, P= prolina).

d) Entrecruzamiento usando enzimas

Un interesante método usando una enzima para sintetizar hidrogeles basados en PEG se ha publicado recientemente. En este método el tetrahidroxi PEG fue funcionalizado con grupos glutaminil (PEG-Q_a). Las redes de PEG fueron formadas por la adición de transglutaminase en solución acuosa de PEG-Q_a y poli(lisina-co-fenilalanina). Esta enzima cataliza la reacción entre el grupo γ -carboxamida de el PEG-Q_a y el grupo ϵ -amina de lisina para producir una unión amida entre los polímeros.

3.3.1.2.- ENTRECruzAMIENTO FÍSICO DE LOS GELES

En los años recientes ha habido un incremento interesante de los geles entrecruzados físicamente. La razón principal es que el uso de agentes de entrecruzamiento para producir hidrogeles es evitado. Estos agentes no solo afectan la integridad de las sustancias capturadas (por ejemplo: proteínas, células) así como también son a menudo compuestos tóxicos, los cuales tienen que ser removidos o extraídos de los geles antes de que estos sean empleados. Es con la finalidad de evitar estos procedimientos el estudio de diferentes métodos de entrecruzamiento físico.

a) Entrecruzamiento por interacción iónica

El alginato es un ejemplo muy conocido de un polímero que puede ser entrecruzado por interacción iónica. El alginato es un polisacárido que puede ser entrecruzado por iones calcio. El entrecruzamiento puede llevarse a cabo a temperatura ambiente y pH fisiológico. Los geles pueden ser desestabilizados por la extracción de iones calcio del gel por un agente quelante. La relación de proteínas de micropartículas de alginato obtenidas por la combinación de solución de alginato de sodio en una solución acuosa de cloruro de calcio, pueden ser moduladas por una capa de partículas con polímeros catiónicos como: quitosano y polilisina. Un polímero sintético que como el alginato puede ser entrecruzado con iones calcio es el poli-[di(carboxilatofenoxi)fosfacene] (PCPP).

b) Entrecruzamiento por Cristalización

El PVA es un polímero soluble en agua. Cuando en solución acuosa es almacenado el PVA a temperatura ambiente este gradualmente forma un gel pero con baja fuerza mecánica, sin embargo en solución acuosa este polímero bajo proceso de congelamiento-descongelamiento se obtiene un fuerte y altamente elástico gel. Las propiedades de este gel dependen del peso molecular del PVA, la concentración del PVA en el agua, la temperatura y el tiempo de congelamiento. La formación del gel es atribuido a la formación de cristales de PVA los cuales actúan como sitios de entrecruzamiento físico en las redes.

c) Entrecruzamiento por enlaces de hidrógeno

El ácido poliacrílico y el ácido polimetacrílico forman complejos con poli(etilen glicol). Estos complejos son sostenidos juntos por enlaces de hidrógeno entre el oxígeno y el poli(etilen glicol) así como el grupo carboxílico del ácido polimetacrílico, donde este juega un rol de interacción hidrofóbica. Los enlaces de hidrógeno no solo se forman cuando el grupo del ácido carboxílico es protonado. Esto implica que el grado de hinchamiento de estos geles es fuertemente dependiente del pH. Por otro lado el complejo de ácido polimetacrílico y poli(etilen glicol) preparado a bajo pH puede ser disuelto con etanol⁽⁶⁹⁾.

d) Entrecruzamiento por interacción de un antígeno-anticuerpo

Miyata et al. ⁽⁷⁰⁾ preparó un hidrogel en el cual un antígeno (IgG conejo) fue incluido a un entrecruzamiento químico de poliacrilamida en presencia del anticuerpo como un entrecruzamiento adicional. El hidrogel presenta un ligero hinchamiento en presencia del antígeno libre debido a el reemplazo del enlace polímero-antígeno resultando el lanzamiento de los anticuerpos y así mismo la disminución de la densidad del entrecruzamiento. La relación de hinchamiento incrementa con el incremento de la concentración del antígeno, pero el proceso no fue totalmente reversible debido a la pérdida de los anticuerpos del hidrogel.

Por otro lado se preparó otro hidrogel para la inmovilización de ambos el antígeno y el anticuerpo en forma de una interpenetración de las redes del polímero. Así mismo un reversible comportamiento de hinchamiento/deshinchamiento fue observado sobre una alternativa exposición del hidrogel que contenga un antígeno y una solución de antígeno libre. Además las membranas de hidrogeles son preparadas exponiendo un comportamiento activo o inactivo con respecto a la permeación de proteínas (hemoglobina) a través de las membranas, este logro permitirá la liberación de drogas en respuesta a un antígeno específico⁽⁷¹⁾.

3.3.1.3.- USO DE TÉCNICAS DE RADIACIÓN PARA LA FORMACIÓN DE HIDROGELES

Las técnicas de radiación tienen muchas ventajas, es una técnica simple, eficiente, limpia. Esta técnica usualmente combina la síntesis y esterilización en un solo paso tecnológico, así reduce costos y tiempo de producción. Una aplicación eficiente y un futuro desarrollo de este método requiere un ensanchamiento del conocimiento básico de la química de radiación de sistemas de polímeros.

Los hidrogeles pueden ser obtenidos por técnicas de radiación en pocos pasos, incluyendo la irradiación del polímero sólido o en solución acuosa, monómero (sólido o en solución). El primer método de irradiación de polímeros hidrofílicos en estado sólido, tuvo algunas desventajas: Se requiere una preparación especial de la muestra (la muestra debe estar derretida o lo suficientemente presionada) así mismo algunas dificultades pueden ser encontradas en la obtención de un hidrogel homogéneo, esto requiere usualmente muchas dosis altas de radiación para obtener un gel comparado con el obtenido por irradiación en solución., así mismo podría dificultar remover todo el oxígeno que podría promover un no deseado sitio de reacción. Una de las razones para una dosis alta de gelación en estado sólido es que el rendimiento de la radiación química de radicales, que son los precursores del entrecruzamiento, es usualmente bajo que en solución acuosa. Las dosis de radiación son calculadas como energía por unidades de masa del sistema. Si nosotros asumimos que la gelación ocurre cuando en promedio un entrecruzamiento es formado por cada cadena de polímero, es obvio que mas entrecruzamiento son necesitados para la gelación de 1 Kg de muestra de polímero sólido, que para la gelación de 1 Kg de su solución diluida ⁽⁷²⁾.

3.3.2.- GRADO DE HINCHAMIENTO⁽⁷³⁾

El grado de hinchamiento puede ser descrito como la capacidad de absorción de agua (Ecuación 5) de los hidrogeles.

$$\text{Absorción de Agua (\%)} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \dots\dots\dots(5)$$

Donde:

W_s = Peso del gel hinchado

W_d = Peso del gel seco.

3.3.3.- *ÍNDICE DE CRISTALINIDAD*⁽⁷⁴⁾

La relación entre el radio del área de la fase cristalina (A_c) y el área total (A_c+A_a) corresponde al índice de cristalinidad:

$$IC = \frac{A_c}{(A_c+A_a)} \times 100 \dots\dots\dots(6)$$

Donde:

A_c = Radio del área correspondiente a la fase cristalina.

A_a = Radio del área correspondiente a la fase amorfa.

3.4.- RADIACIÓN GAMMA

La radiación gamma esta compuesta de fotones emitidos en el transcurso del proceso de transición nuclear o aniquilación de partículas. La radiación gamma es mas penetrante que la radiación α y β .

Dada su alta energía pueden causar grave daño al núcleo de las células, por lo que son usados para esterilizar equipos médicos y alimentos.

Los radioisótopos emisores de radiación gamma más conocidos son: Americio-241, Iodo-129, Iodo-131, Thorio-232, Uranio-238, Cobalto-60, Cesio-137, Tecnecio-99 entre otros, siendo estos tres últimos los más conocidos y empleados.

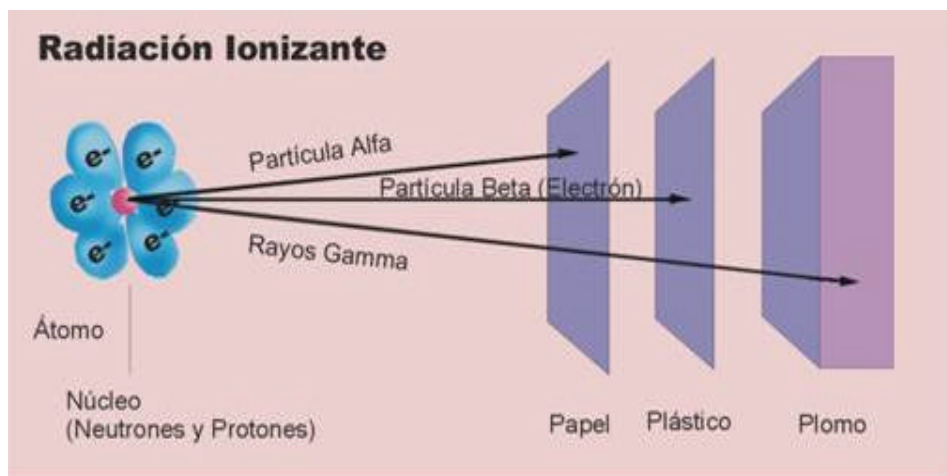


Fig. 20 La radiación gamma tiene mayor poder de Penetración que la radiación α o β

El efecto de la radiación en polisacáridos como el quitosano, alginato de sodio, celulosa, pectina, etc son investigados para inducir su actividad biológica. Estos carbohidratos son fácilmente degradados por irradiación y así son inducidos para diferentes actividades biológicas.

Los estudios de hoy en día están focalizados en las condiciones óptimas para emplear irradiación γ con el objeto de reducir el peso molecular de quitosano pero manteniendo su estructura química ya que se conserva su funcionalidad. La degradación empleando radiación gamma ocurre en la región amorfa de donde las cadenas del polímero están débilmente empaquetadas⁽⁷⁶⁾.

Varias técnicas como tratamiento químico, degradación enzimática y foto-irradiación fueron empleadas con el objetivo de tener quitosanos de bajo peso molecular. La hidrólisis ácida o básica es un proceso efectivo pero cambia el grado de deacetilación, así como la falta de reproducibilidad son desventajas de este proceso. La degradación enzimática a condiciones suaves es otra técnica propuesta pero tiene como desventaja que es un proceso tedioso debido a que requiere muchos pasos de preparación enzimática. La significativa reducción del Peso Molecular implica una cadena de degradación.

La radiación induce las reacciones químicas para la modificación de polímeros en estado sólido, acuoso o a bajas temperaturas.

El tratamiento con Radiación es potencial como pasteurización o esterilización de microorganismos contaminantes. Así mismo la irradiación gamma es hoy en día utilizada para la esterilización de productos médicos y preservación de alimentos por su alta poder de penetración⁽⁷⁷⁾.

La irradiación gamma y electron-beam son los mas populares y mas establecidos procesos para la esterilización de polímeros usados en los dispositivos médicos.

Una alta energía de radiación produce ionización y excitación en las moléculas del polímero. Así mismo esta rica energía produce reacciones de disociación, eliminación y adición en una secuencia de producir una estabilidad química. El proceso de estabilización, el cual ocurre durante, inmediatamente después, o en algunos días, semanas o meses después de la irradiación, da a menudo resultados de entrecruzamiento físico y químico o un rompimiento en la cadena, los cuales se evidencian en cambios físicos que pueden incluir fragilidad, decoloración, generación de olor, endurecimiento, ablandamiento, incremento o reducción de la resistencia química y un incremento o decaimiento del punto de fusión.

La radiación por ionización es una de las poderosas técnicas para modificar polímeros, particularmente desde que los cambios ocurren cuando los materiales están en estado sólido, así mismo reacciones químicas o térmicas pueden llevarse a cabo en caliente o en polímeros derretidos. Mientras que en estado sólido puede tener significativas ventajas, cualquier cambio en las características del material o funcionamiento llevados a cabo por la radiación son gobernados por la relación estructura/propiedades que son análogos a estos generados por otros procesos químicos y térmicos. Estos incluye polimerización, injertos, entrecruzamiento, cambios en la saturación, rompimiento de la cadena (degradación), oxidación, ciclización, isomerización, amorfización y cristalización.

Muchas importantes propiedades físicas o químicas de los polímeros pueden ser modificadas con la radiación. Entre ellas tenemos: peso molecular; longitud, polidispersidad, ramificación, funcionalidad y terminación de la cadena; entendiendo como y cuales son las implicaciones de estas características pueden ser alteradas en función de los niveles de exposición de radiación (dosis) la cual es crucial para predecir el funcionamiento y utilidad de los polímeros irradiados.

La influencia de la radiación en las propiedades y funcionamiento de un polímero se diferencia de acuerdo a si el material es degradado o existe un entrecruzamiento, y esto depende de específicas susceptibilidad inherentes a la cadena principal del polímero.

Todos los materiales pueden encontrar una rotura a dosis muy altas de radiación; sin embargo el rango de dosis bajas a las cuales el polímero mantiene sus propiedades deseables depende grandemente de la estructura química del polímero; empleando niveles por debajo de la destrucción a la exposición, el tratamiento con radiación puede impartir muchos beneficios e incrementar las propiedades comerciales del polímero⁽⁷⁸⁾.

3.4.1.- EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA

Los efectos de la radiación por ionización depende grandemente de la estructura química del polímero, las dosis necesarias para producir un significativo efecto en dos materiales diferentes puede variar de valores como por ejemplo: 4 kGy en politetrafluoretileno a 4000 kGy o mas en estireno o poliimida. Bajas dosis sin embargo pueden generar significativas alteraciones. Un ejemplo típico es el polietileno con peso molecular de cerca de 100,000 el cual es rápidamente soluble en solventes como Decahidronaftaleno, solo con un entrecruzamiento con 14,000 unidades de monómeros (etileno) puede causar insolubilidad.

El efecto de la radiación en las propiedades del polímero pueden también ser difíciles de predecir especialmente en la presencia de ciertos aditivos que pueden ayudar a prevenir los daños por radiación. Estos compuestos son generalmente llamados como “antirradiación”, son sustancias que actúan como anti-oxidantes, funcionan como reactantes, combinándose rápidamente con la radiación que genera radicales libres en el polímero, así como una energía primaria absorbe y previene la interacción entre la radiación y el propio polímero.

La radiación normalmente afecta al polímero en 2 maneras básicas, ambas resultan de la excitación o ionización de los átomos. Los 2 mecanismos son por ruptura de la cadena, un rompimiento al azar de los enlaces los cuales reducen el peso molecular (por ejemplo fuerza) del polímero, y el entrecruzamiento de las moléculas, de los cuales resulta la formación de largas redes de molécula tridimensional.

El entrecruzamiento por radiación afecta las características mecánicas del material, la estabilidad del química y la resistencia química del polímero.

Más a menudo, ambos de estos mecanismos ocurren en materiales poliméricos sujetos a la radiación por ionización, pero frecuentemente un mecanismo predomina dentro de un polímero específico.

Como resultado de un rompimiento en la cadena pueden aparecer: fragmentos de un bajo peso molecular, generación de gas y enlaces insaturados.

El entrecruzamiento del polímero permite tolerar más temperatura y el incremento a la resistencia de la abrasión.

Para polímeros con enlaces carbono-carbono (enlaces principales) se puede observar que el entrecruzamiento generalmente puede ocurrir si los carbonos tienen uno o más átomos de hidrógeno, cualquier rompimiento en la cadena ocurre en el carbono tetrasustituido. Polímeros que tienen grupos aromáticos generalmente son más resistentes a la degradación por radiación en comparación con los polímeros alifáticos; Por ejemplo el poliestireno con un grupo aromático en su cadena y las poliimidas con un grupo aromático directamente en la cadena principal son relativamente resistentes a dosis altas de radiación (> 4000 kGy).

Cuando un polímero es sujeto a radiación por ionización como rayos gamma, rayos x, o electrón beam-varios efectos pueden ser esperados de la ionización que ocurre.

La relación de combinaciones resultantes, el entrecruzamiento y el rompimiento de la cadena pueden variar de polímero a polímero y el grado de variación está basado en la composición y morfología química del polímero, la dosis total de radiación absorbida y la relación en la cual la dosis fue depositada. La relación es también significativamente afectada por la tensión residual del proceso, el ambiente presente durante la irradiación (especialmente la presencia o ausencia de oxígeno) y el ambiente después de la irradiación (temperatura y oxígeno)⁽⁷⁹⁾.

a) Efecto del Oxígeno y la dosis de radiación:

Las condiciones ambientales después del proceso de radiación puede afectar significativamente las propiedades del material polimérico. Por ejemplo la presencia de oxígeno o aire durante la irradiación produce radicales libres que son rápidamente convertidos a radicales peroxídicos. La suerte de estos radicales depende de la naturaleza del polímero irradiado, la presencia de aditivos y otros parámetros como temperatura, dosis total, proporción de la dosis, y tamaño de la muestra. Una variación en las condiciones del

proceso es la presencia de aditivos en el polímero que pueden generar la formación de un gas así como la formación de otros productos de degradación de estas moléculas los cuales pueden ser compuestos irritantes u otros productos no deseados.

Cuando un polímero es irradiado se forman radicales proporcionalmente a la concentración de la dosis. Sin embargo la estabilidad química esta asociada con reacciones que son proporcionales a la concentración de reactantes, debido a que la concentración de reactantes difiere por la localización (por ejemplo: alta concentración de oxígeno cerca de la superficie exterior), el resultado de la reacción química estabilizante es heterogénea.

En la irradiación gamma la aplicación de la energía ionizante continua por encima de un periodo largo de tiempo, seguidamente reactantes como el oxígeno penetran dentro de todas las áreas del material, resultando un alto grado de rompimiento de la cadena.

b) Formación de color y olor

Un efecto común no deseable que resulta de la radiación en algunos polímeros es la decoloración (generalmente amarillento) del desarrollo de cromóforos específicos de centros de color del polímero. El desarrollo del color el cual difiere de la dosis, puede disminuir o incrementar con el tiempo de almacenamiento después de la irradiación, a menudo la decoloración aparece antes de la medida de la disminución en las propiedades físicas.

Otro problema común en algunos polímeros como resultado de específicas reacciones químicas estabilizantes es el olor. Los polímeros que mas comúnmente presentan olor después de la irradiación son el polietileno, PVC y poliuretano (presentan un olor rancio).

Acá se involucra el bajo peso molecular, productos de degradación por oxidación del polímero como responsables de los olores no deseados de alta volatilidad y actividad sensorial después de los tratamientos de irradiación.

Si las reacciones químicas causan olor esto se puede mitigar empleando antioxidantes, diferentes temperaturas en el proceso o con la selección de un polímero de alto peso molecular⁽⁸⁰⁾.

La degradación en solución es mas grande que en el estado sólido. Esto es debido a los radicales $H\bullet$ y $\bullet OH$ formados por la radiólisis durante la irradiación del agua, la reacción

entre los radicales libres y las moléculas del quitosano que van a conducir a una rápida degradación del quitosano en medio acuoso⁽⁸¹⁾.

De estudios realizados se observa que muestras irradiadas bajo condiciones de vacío presentan ligeramente menor disminución en el peso molecular que muestras irradiadas bajo presencia de oxígeno lo cual es entendido como un efecto indirecto por degradación oxidativa.

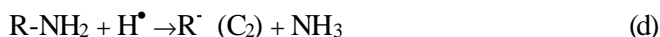
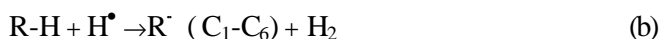
Así mismo también se observa que a medida que se aumenta la dosis de radiación las muestras en soluciones acuosas se van poniendo ligeramente marrón, este color puede desaparecer si se emplea un tratamiento con ozono.

Radiólisis del Agua:



Mecanismo de Degradación en estado sólido:

Ershov et al.⁽⁸²⁾ propone un esquema de mecanismo de degradación de quitosanos irradiados en estado sólido:



Donde:

R-H y R-NH₂ son macromoléculas de quitosano.

R• (C_n) es un macrorradical de quitosano localizado en los átomos de carbono (C_n).

F•₁ + F₂ son fragmentos de la cadena principal después del rompimiento.

IV.- PARTE EXPERIMENTAL

4.1.- MATERIALES

4.1.1.- MATERIALES Y EQUIPOS

Equipo de vidrio para filtración al vacío, termómetro capacidad medición 110°C, vasos de precipitados de 400 mL, baguetas, lunas de reloj y morteros.

Estufa, agitador magnético, balanza 0,1 g precisión.

Espectrofotómetro infrarrojo (Espectrofotómetro FT-IR, Marca: Nicolet, Modelo: Impact 410).

Espectrofotómetro UV-VIS. (Espectrofotómetro UV-VIS, Marca: Perkin Elmer, Modelo: Lambda 40P).

Equipo de radiación gamma (Marca: Nordion, Modelo: Gammacell 220) con una fuente de Co-60 doblemente encapsulado con acero inoxidable y con una tasa de radiación de 16 kGy/h.

4.1.2 REACTIVOS

Plumas de Pota, HCl 2N, NaOH al 10%, NaOH al 50%, agua desionizada, ácido acético 0.1M, Etanol, KBr, papel indicador.

4.2.- MÉTODOS EMPLEADOS

4.2.1.- MÉTODO EMPLEADO PARA LA OBTENCIÓN DE QUITOSANO DE POTA (Dosidicus gigas)

a) Empleando el Método Convencional⁽⁸³⁾

Procedimiento:

- 1) Se trató aproximadamente 800 g de plumas de pota (previamente lavadas y cortadas) con HCl 2N a temperatura ambiente durante una noche.
- 2) Posteriormente se lavó el material con abundante agua desionizada hasta pH 7.0 y se redujo a tamaño más pequeño con la ayuda de una licuadora.
- 3) El material resultante se procedió a tratar con NaOH 10% a temperatura ambiente por 24h.

- 4) Posteriormente se procedió a lavar el material con abundante agua desionizada hasta pH 7.0 y se trató con NaOH 2N, se deja en calentamiento por 4h. a 100 °C para obtener Quitina, **ChiP**.
- 5) El producto obtenido se trató con NaOH 50% y se dejó en calentamiento aproximadamente por 8h a 100 °C, para obtener quitosano, **ChP** (se verificó la obtención de quitosano al hacer la prueba de solubilidad en ácido acético 0.1 M)
- 6) Finalmente se lavó con abundante agua desionizada hasta pH 7.0, se procedió a reducir el tamaño del producto obtenido, con la ayuda de una licuadora, para obtener un grano mas fino, finalmente se secó al vacío con etanol y posteriormente en la estufa por 24 h. a 50°C.

b) Empleando Radiación Gamma

Para el control de la dosis de irradiación se debe asegurar que la técnica se usa correctamente y que las dosis aplicadas son las adecuadas.

La dosis absorbida se determina usando productos naturales o sintéticos, sólidos o líquidos, cuya respuesta a la radiación es conocida. A estos productos se les conoce como dosímetros, representan la variación lineal de una propiedad física con la dosis absorbida.

Se empleo Dosímetro Fricke, el cual está basado en el cambio de valencia (oxidación, $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$) que se produce en una solución ácida de sal ferrosa por acción de la radiación ionizante. La cantidad de ion férrico (Fe^{3+}) producida es proporcional a la dosis de radiación recibida por la muestra.

ANÁLISIS DOSIMÉTRICO :

- 1.-Intercomparación de Tasa de Dosis en el Punto Central del Cilindro de Irradiación vacío del Gammacell 220 Excel. Verificación de la Solución Fricke al 21 de Junio del 2005.

Tasa de Dosis GC-220 EXCEL MDS NORDION	Tasa de Dosis GC-220 EXCEL IPEN – APLI- LI	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	%PORCENTAJE DE ERROR
16,00948 kGy/h	15,78332 kGy/h	0,99965	1,51

METODOS UTILIZADOS :

- ASTM E 1026 – 1995 Practice for Using the Fricke Reference Standard Dosimetry System

b.1) Empleando Radiación Gamma en diferentes dosis: 10, 15, 20, 30, 35 y 40 kGy, desde el Inicio del proceso.

Procedimiento:

- 1) Aproximadamente 800 g de plumas de pota (previamente lavadas y cortadas) en medio acuoso fueron irradiadas en dosis entre 10 y 40 kGy; 10 kGy (**PaI10**), 15 kGy (**PaI15**), 20 kGy (**PaI20**), 30 kGy (**PaI30**), 35 kGy (**PaI35**) y 40 kGy (**PaI40**).
- 2) Posteriormente se trataron las muestras con HCl 2N a temperatura ambiente durante 6h., enseguida se lavó las muestras con abundante agua desionizada hasta pH 7.0, así como se redujo el tamaño de las mismas (se empleó para ello una licuadora).
- 3) Seguidamente se procedió a tratar las muestras con NaOH 10% a temperatura ambiente por 6h., enseguida se procedió a lavar las muestras con abundante agua desionizada hasta pH 7.0.
- 4) Posteriormente se trató las muestras se trataron con NaOH 2N, se dejó en calentamiento por 4h. a 100 °C. Se obtienen las quitinas **ChiPaI10**, **ChiPaI15**, **ChiPaI120**, **ChiPaI30**, **ChiPaI35** y **ChiPaI40** respectivamente.
- 5) Las muestras obtenidas se trataron con NaOH 50% con calentamiento a 100 °C entre 1h y 15 min-2h y 25 min. (dependiendo de la solubilidad de las muestras en ácido acético 0.1 M).

- 6) Finalmente los productos ChPaI10, ChPaI15, ChPaI20, ChPaI30, ChPaI35 y ChPaI40 se lavaron con abundante agua desionizada hasta pH 7.0, luego se secó al vacío con etanol y posteriormente en la estufa por 24 h a 50°C.

b.2) Empleando Radiación Gamma en una dosis de 25 kGy desde el Inicio del proceso.

Procedimiento:

- 1) Se trabajó con aproximadamente 800 g de plumas de pota, se lavó el material con abundante agua desionizada hasta pH 7.0 y se redujo el tamaño del material (se empleo para ello una licuadora); se separó 2 muestras.
- 2) Una de las muestras se seco al vacío con etanol y posteriormente en la estufa a 50 °C por 24h. (Ps).
- 3) La muestra húmeda se trato con 10 mL de agua (Pa).
- 4) Las muestras Ps y Pa se trato con 25 kGy de radiación “ γ ” y se obtuvo: PsI y PaI.
- 5) Se procedió a tratar PsI y PaI de forma similar a b.1 (2).
- 6) Seguidamente se procedió a tratar las muestras de forma similar a b.1 (3).
- 7) Posteriormente se procedió a tratar las muestras igual al ítem b.1(4). Se obtuvieron las quitinas ChiPsI3 y ChiPaI3.
- 8) Las muestras, se trataron con NaOH 50% con calentamiento a 100 °C entre 1h y 20 min.-1h y 35 min. (dependiendo de la solubilidad de las muestras en ácido acético 0.1 M).
- 9) Finalmente los productos ChPsI3 y ChPaI3 se lavaron con abundante agua desionizada hasta pH 7.0, luego se seco al vacío con etanol y posteriormente en la estufa por 24 h a 50°C.

b.3) Empleando Radiación Gamma en una dosis de 25 kGy después del tratamiento ácido.

Procedimiento:

- 1) Se trabajó con aproximadamente 800 g de plumas de pota, se trato de igual manera que en b.2 (1).
- 2) Seguidamente se trato las muestras en forma similar a b.1 (2) y se separó 2 muestras.
- 3) Una de las muestras se trató de manera similar a b.2 (2) y se obtuvo: Pacs.
- 4) La muestra húmeda se trató con 10 mL de agua (Paca).
- 5) Las muestras se trataron con 25 kGy de radiación “ γ ” y se obtuvo: PacsI y PacaI.
- 6) Se trató las muestras de manera similar a b.1 (3).
- 7) Seguidamente las muestras se trataron igual al ítem b.1 (4) y se obtuvo las quitinas ChiPsI2 y ChiPaI2.
- 8) Las muestras, se trataron con NaOH 50% con calentamiento a 100 °C entre 1h y 30 min.-1h y 40 min. (dependiendo de la solubilidad de las muestras en ácido acético 0.1 M).
- 9) Finalmente los productos ChPsI2 y ChPaI2 se lavaron con abundante agua desionizada hasta pH 7.0, luego se secó al vacío con etanol y posteriormente en la estufa por 24 h a 50°C.

b.4) Empleando Radiación Gamma en una dosis de 25 kGy antes de Obtener Quitina.

Procedimiento:

- 1) Se trabajó con aproximadamente 800 g de plumas de pota, se trato de igual manera que en b.2 (1).
- 2) Posteriormente se trató la muestra de manera similar a b.1 (2).
- 3) Seguidamente se procedió a tratar la muestra igual que en el ítem b.1 (3). Se separó 2 muestras.

- 4) Una de las muestras se trató de manera similar a b.2 (2) y se obtuvo: BChPs.
- 5) La muestra húmeda se trató con 10 mL de agua (BChPa).
- 6) Las muestras se trataron con 25 kGy de radiación “ γ ” y se obtuvo: BChPsI, BchPaI.
- 7) Las muestras se trataron igual al ítem b.1 (4) y se obtuvieron las quitinas ChiPsI y ChiPaI.
- 8) Las muestras se trataron con NaOH 50% con calentamiento a 100 °C entre 1h y 50 min.-3 h. (dependiendo de la solubilidad de las muestras en ácido acético 0.1 M).
- 9) Finalmente los productos ChPsI y ChPaI se lavaron con abundante agua desionizada hasta pH 7.0, luego se seco al vacío con etanol y posteriormente en la estufa por 24 h a 50°C.

b.5) Empleando Radiación Gamma en una dosis de 25 kGy después de obtener Quitina

Procedimiento:

- 1) Se trabajó con aproximadamente 800 g de plumas de pota, se trato de igual manera que en b.2 (1).
- 2) Posteriormente se trató la muestra de manera similar a b.1 (2).
- 3) Seguidamente se procedió a tratar la muestra igual que en el ítem b.1 (3).
- 4) Posteriormente se procedió a tratar las muestras igual al ítem b.1 (4) y se obtiene la quitina ChiP1, se separó en 2 muestras.
- 5) Una de las muestras se trató igual a b.2 (2) y se obtiene ChiPs1.
- 6) La muestra húmeda se trato con 10 mL de agua (ChiPa1).
- 7) Las muestras se trataron con 25 kGy de radiación “ γ ” y se obtiene: ChiPsI1 y ChiPaI1.
- 8) Las muestras, se trataron con NaOH 50% con calentamiento a 100 °C entre 1h 1h y 30 min. (dependiendo de la solubilidad de las muestras en ácido acético 0.1 M).
- 9) Finalmente los productos ChPsI1 y ChPaI1 se lavaron con abundante agua desionizada hasta pH 7.0, luego se seco al vacío con etanol y posteriormente en la estufa por 24 h a 50°C.

4.2.2.- CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO DE POTA (*Dosidicus gigas*)

a) Determinación del Grado de Deacetilación del Quitosano por Espectroscopía

Infrarroja⁽⁸⁴⁾

Procedimiento:

Aproximadamente 50 mg de quitosano, previamente secado al vacío, se mezclaron y se trituran con 100 mg de bromuro de potasio y secado a 80 °C en un horno de aire seco por espacio de 2 horas antes del análisis. Aproximadamente 50 mg de este producto fueron utilizados para preparar una mezcla uniforme y compacta para el análisis por IR. (Equipo Empleado: Espectrofotómetro FT-IR, Marca: Nicolet, Modelo: Impact 410) escanear entre 4000 a 400 cm^{-1} , y de 0 a 100 %T.

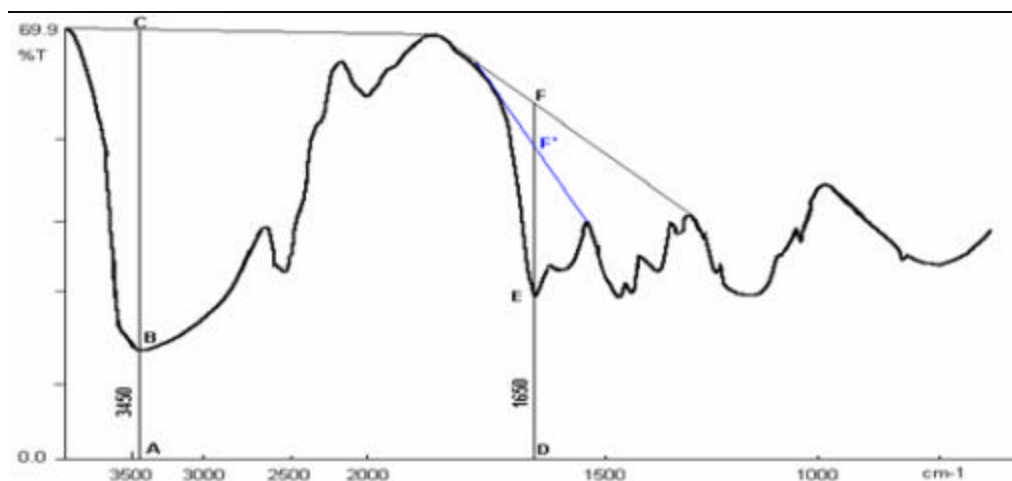


Fig. 21 Típico espectro infrarrojo de quitosano

Cálculos

Medir los segmentos A, B, C, D, E y F en el gráfico según Figura 22.

$$\text{Log}_{10} (DF/DE) = A_{1655}$$

$$\text{Log}_{10} (AC/AB) = A_{3450}$$

$$\% \text{ DD} = 97.67 - [26.486 \times A_{1655} / A_{3450}] \text{ (Método de Sabnis, usa línea base que pasa por F)}$$

$$\% \text{ DD} = 100 - [115 \times A_{1655} / A_{3450}] \text{ (Método de Baxter, usa la línea base que pasa por F')}$$

b) Determinación del Grado de Deacetilación del Quitosano por Titulación Metacromática⁽⁸⁵⁾

Procedimiento:

1. Preparación de la Solución de Orange II [4-(2-hidroxi-1-naftilazo) bencensulfonato de sodio] de aproximadamente 5×10^{-4} M. Se Pese 0.1750 g de la sal previamente purificado por recristalización a partir de etanol acuoso al 80% y secado a 120°C por 2 horas. Se disolvió en 1 L de solución de ácido acético 0.1 M. Se tomo una alícuota de 10 mL y se diluyo a 100 mL con 0.1 M de ácido acético. Se midió el coeficiente de extinción de la solución frente a un blanco de 0.1 M de ácido acético y se comparo con el valor teórico de $22,500 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ para determinar la molaridad de esta solución.
2. Se disolvió 0.1 g de quitosano (ChF) pesado con exactitud de 0.1mg en 1 L de 0.1 M de ácido acético.
3. Se adicionó a 5 fioas de 100 mL 10.0 mL de la solución Orange II y aproximadamente 40 mL de 0.1 M de ácido acético. Los siguientes volúmenes de la solución de quitosano (ChF) se añadieron a las fioas: 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL y se enrazo casa solución con 0.1 M de ácido acético.
4. Se miden las absorbancias a 484 nm usando la solución de 0.1 M de ácido acético como solución de referencia.
5. Se grafica absorbancia versus volumen de quitosano (ChF) añadido en la solución. Se obtiene el punto de intersección en mL de la solución de quitosano equivalente, en términos de concentración del grupo amino, a 10 mL de la solución stock del colorante de molaridad conocida.

Cálculos

Se calculo el peso equivalente del grupo amino, EW:

$$EW = (W \times V) / 10 C$$

Donde:

W = peso (g) de quitosano (ChF) secado en estufa y disuelto en 1L de 0.1M de ácido acético,

V = volumen (mL) de la solución de quitosano añadido en el punto final,

C = concentración de la solución del colorante orange (aproximadamente 5×10^{-4} M).

Grado de Deacetilación (%DD): $\% DD = 100 - \{[(EW - 161) \times 100] / (EW + 42)\}$

c) Determinación del Peso Molecular del Quitosano por Viscosidad Intrínseca⁽⁸⁶⁾

Procedimiento

1. Se procedió a la preparación del disolvente el cual es una mezcla de 0.5M de ácido acético y 0.2M de acetato de sodio: Se pesaron 49.2 g de acetato de sodio y 90 g de ácido acético glacial y se disolvió en tres litros de agua destilada.
2. Se prepararon soluciones de 0.1000 g / 100 mL de una muestra de quitosano a determinar su peso molecular (ChP, ChPsI, ChPaI, ChPaI10, ChPaI15, ChPaI20, ChPaI30, ChPaI35, ChPaI40, ChPsI1, ChPaI1, ChPsI2, ChPaI2, ChPsI3 y ChPaI3) a partir del cual se toman las siguientes alícuotas (mL): 25.0 en 50.0, 20.0 en 50.0, 10.0 en 50 y 5 en 50, se enrasa con el disolvente, obteniendo así soluciones de 1000, 500, 400, 200 y 100 mg/L.
3. Se midieron las densidades de las soluciones por el método del picnómetro a una misma temperatura.
4. Se midieron las viscosidades de las soluciones empleando el viscosímetro de Ubbelohde a la misma temperatura anterior.
5. Se siguió los pasos 2, 3 y 4 con cada muestra de quitosano tratados independientemente.
6. Se calculo la viscosidad específica de cada solución, η_{sp} , y se grafico η_{sp}/C versus C, donde C es la concentración (mg/L) de la solución de quitosano. El intercepto de la

recta es la viscosidad intrínseca de la muestra de quitosano, $[\eta]$, que se aplico en la fórmula para el cálculo del peso molecular.

Cálculos:

Cálculo de la viscosidad intrínseca de una solución:

Viscosidad relativa $\eta_r = \eta / \eta_0 \equiv t / t_0$

Viscosidad específica $\eta_{sp} = \eta_r - 1$

Viscosidad intrínseca $[\eta] = (\eta_{sp} / c)_{c=0}$

c = concentración en g/dL, $[\eta]$ será expresado en dL / g o este valor se puede multiplicar por 100 y expresarlo en mL / g

La viscosidad intrínseca se calcula aplicando la ecuación de Huggins que relaciona la viscosidad reducida (η_{sp} / c_2) con la concentración:

$$(\eta_{sp} / c_2) = [\eta] + K [\eta]^2 c_2$$

La representación de la viscosidad reducida como función de la concentración para las muestras de quitosano en todos los casos se observa una disminución de la viscosidad reducida a medida que la concentración del polímero disminuye, lo que indica que se cumple la expresión de Huggins para el polímero en estudio, en las condiciones de trabajo utilizadas.

La correlación entre la viscosidad Intrínseca y el peso molecular esta expresada en la siguiente ecuación:

$$[\eta] = KM^A, \text{ para } K = 0.00035, A = 0.76.$$

Donde:

K= Indica un parámetro de viscosidad, el cual esta en función del solvente así como del tipo del polímero, para el quitosano en solución de 0.5M de ácido acético y 0.2M de acetato de sodio el valor es de 3.5×10^{-4} .

4.2.3.- DETERMINACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DEL QUITOSANO DE POTA EMPLEANDO MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM).

Para la determinación de la estructura morfológica del quitosano de Pota se empleo la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). El equipo empleado fue un Microscopio Electrónico de Barrido SEM XL20 marca Philips equipado con detector de electrones secundarios, retrodispersados y micro analizador de rayos por energía dispersiva EDAX DX-4i. Este equipo cuenta con una amplificación de imagen de 400,000 x y una resolución de 6nm a 30 Kv.

Las muestras (Quitosano de Pota y Langostino respectivamente) para ser analizadas fueron secadas, posteriormente metalizadas con oro y finalmente fotografiadas. (Ver Gráfico 5.7-5.10)

4.2.4.- DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE CRISTALINIDAD (ANGULO 2θ) DEL PICO AMORFO Y CRISTALINO.

Para la determinación de las formas polimórficas del Quitosano y los hidrogeles se empleó un Difractómetro de Rayos X: Marca Rigax, modelo Miniflex con $\text{CuK}\alpha$ como fuente de Rayos X (40 kV, 30 mA) y un filtro de Níquel. Las muestras fueron escaneadas en el rango de 2θ de 10 a 35° en forma de films secadas a temperatura ambiente.

Para la determinación de los valores de Índice de Cristalinidad se empleo la ecuación (6).

4.2.5.- OBTENCIÓN DE HIDROGELES PVA/QUITOSANO DE POTA.

- a) Se preparó solución acuosa de PVA al 10% (P) , así mismo se disolvió quitosano de Pota al 1% en ácido acético 0.1 M (Q).
- b) Se procedió a realizar las siguientes mezclas: 10 mL de P +0 mL de Q (10P0Q), 8 mL de P+ 2 mL de Q (8P2Q), 6 mL de P+ 4 mL de Q (6P4Q), 4 mL de P+ 6 mL Q (4P4Q), 2 mL de P+ 8 mL de Q (2P8Q), 0 mL de P+10 mL de P (0P10Q).
- c) Posteriormente a cada una de las mezclas realizadas se irradió con radiación gamma en una dosis de 10 kGy.
- d) Seguidamente los hidrogeles obtenidos fueron caracterizados por su porcentaje de hinchamiento, para ello se empleó la ecuación (5).

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

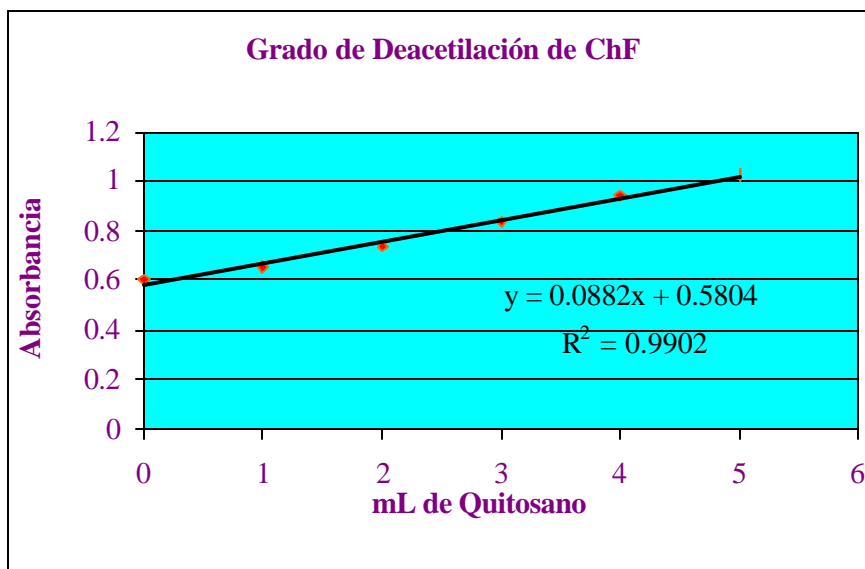
Se ha logrado obtener quitosano de Pota (*Dosidicus gigas*) por el método convencional, así como empleando diferentes dosis de radiación gamma (10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 kGy). Así mismo se ha determinado el grado de deacetilación y el peso molecular de cada uno de ellos.

En este trabajo se ha empleado como referencia a un quitosano comercial de la marca Fluka, quitosano proveniente del caparazón de cangrejo (ChF).

Tabla 5.1.- Porcentaje de Grado de Deacetilación de ChF empleando el Método de Titulación Metacromática.

Volumen (mL) ChF añadido	Absorbancia (nm)	% DD
0	0.604	87.50%
1	0.654	
2	0.738	
3	0.838	
4	0.945	
5	1.027	

Gráfico 5.1.- Determinación del Grado de Deacetilación del Quitosano ChF empleando el Método de Titulación Metacromática.



Para el quitosano de referencia se ha empleado el método de titulación metacromática y la Espectroscopia FTIR (Método de Sabnis y Baxter) para la determinación del grado de deacetilación se ha obtenido valores de 87.5%, que corresponden al primero; 86.7% y 84.1% que corresponden al segundo respectivamente, por lo cual debido a que los valores son cercanos se ha considerado en este trabajo determinar el grado de deacetilación empleando Espectroscopia FTIR de acuerdo al método de Sabnis que es la técnica que nos da valores más cercanos al compararlo con el método de titulación metacromática, se ha optado por esta técnica debido a que constituye un análisis rápido y fácil de manejar; así mismo el peso molecular obtenido por el método de Viscosidad Intrínseca fue de 587 kDa.

El quitosano de Pota (ChP) obtenido por el método convencional presenta un grado de deacetilación por Espectroscopia Infrarroja, Método de Sabnis, de 88.1% así mismo por el método de Baxter es de 85.4%, la diferencia de estos valores es principalmente debido a que los dos autores difieren con respecto al pico de la amida, ya que toman diferentes segmentos en el cálculo del grado de deacetilación; el peso molecular obtenido empleando el Método de Viscosidad Intrínseca fue de 673 kDa lo cual constituye la obtención de un biopolímero de alto peso molecular que involucra mayor número de grupos amino protonados en la solución ácida de quitosano

Gráfico 5.2.- Determinación del Peso Molecular del Quitosano ChF y ChP empleando el Método de Viscosidad Intrínseca.

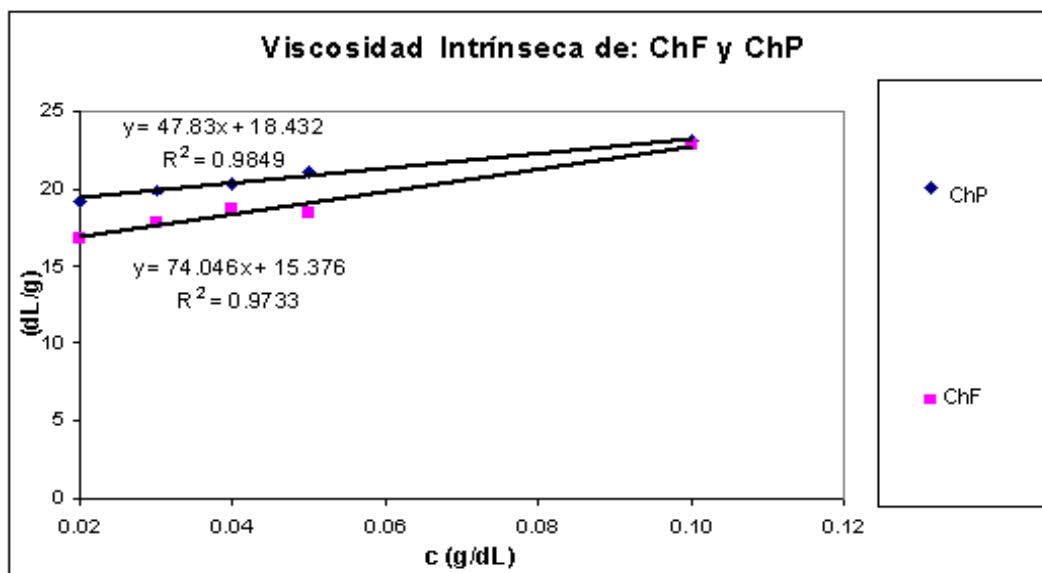
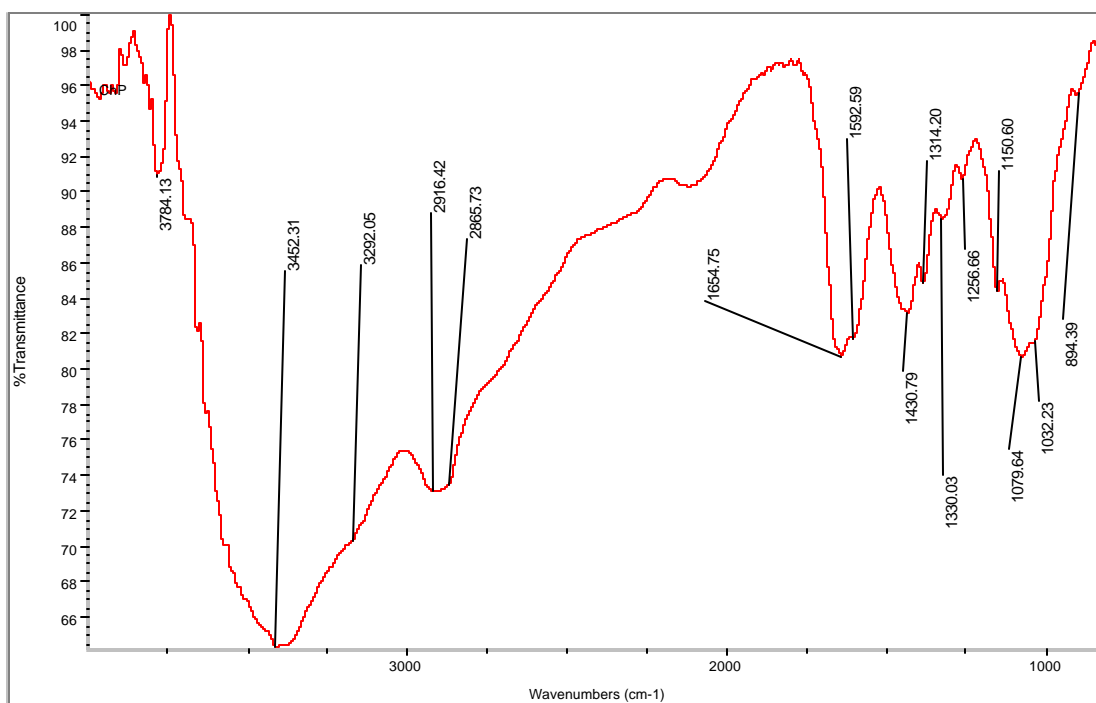
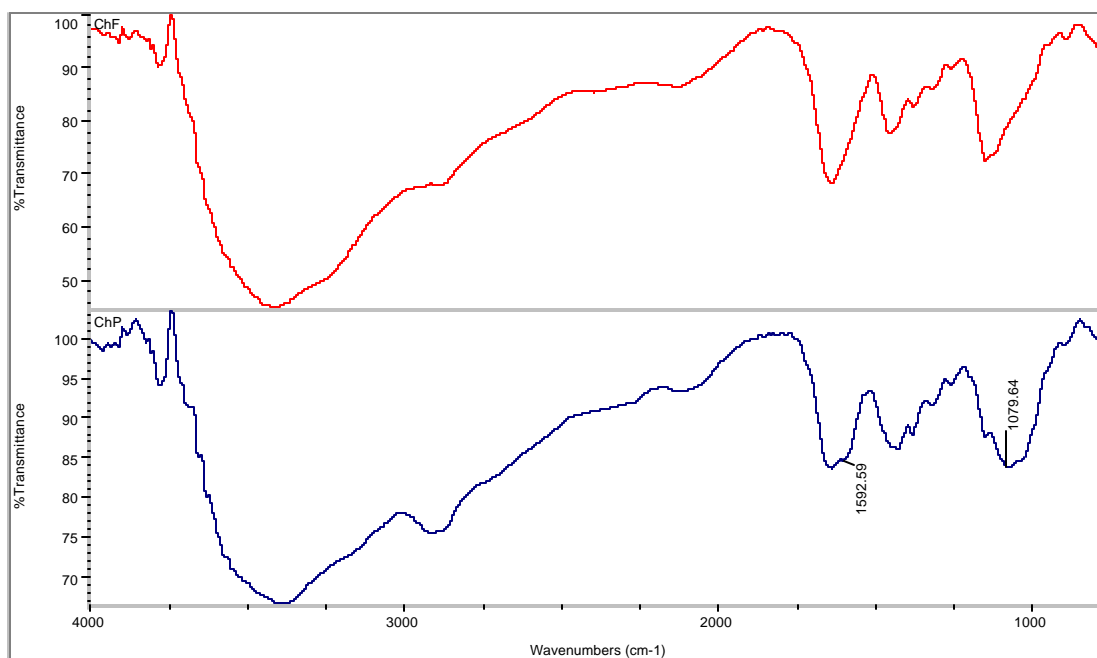


Gráfico 5.3.- Espectro FTIR del Quitosano de Pota (ChP) obtenido por el Método Convencional.



En el espectro 5.1. Se pueden apreciar las bandas : 3452.31 cm^{-1} (grupo -OH), a 3292.05 cm^{-1} (grupo N-H), a 2916.42 y 2865.73 cm^{-1} (grupo C-H), a 1654.75 cm^{-1} (amida I), a 1592.59 cm^{-1} (doblaje del grupo -NH₂), a 1314.20 cm^{-1} (amida III), a 1150.60 cm^{-1} (tensión antisimétrica del puente C-O-C), a 1079.64 y 1032.23 cm^{-1} (vibraciones del esqueleto propias de su estructura piranósica) y a 894.39 cm^{-1} (tensión C-H de los grupos anoméricos).

Gráfico 5.4.- Espectro FTIR del Quitosano de Pota (ChP) y quitosano de Referencia (ChF).



Del gráfico 5.4, se observa la similitud entre los 2 espectros de quitosano, diferenciando principalmente en que el espectro de ChP presenta los picos bien definidos a 1592.59 y 1079.64 cm^{-1} que no presenta el espectro de ChF; esta diferencia se atribuye al hecho de que los quitosanos se han obtenido de fuentes diferentes.

Gráfico 5.5.- Espectro de Difracción de Rayos X de Quitosano⁽⁸⁷⁾

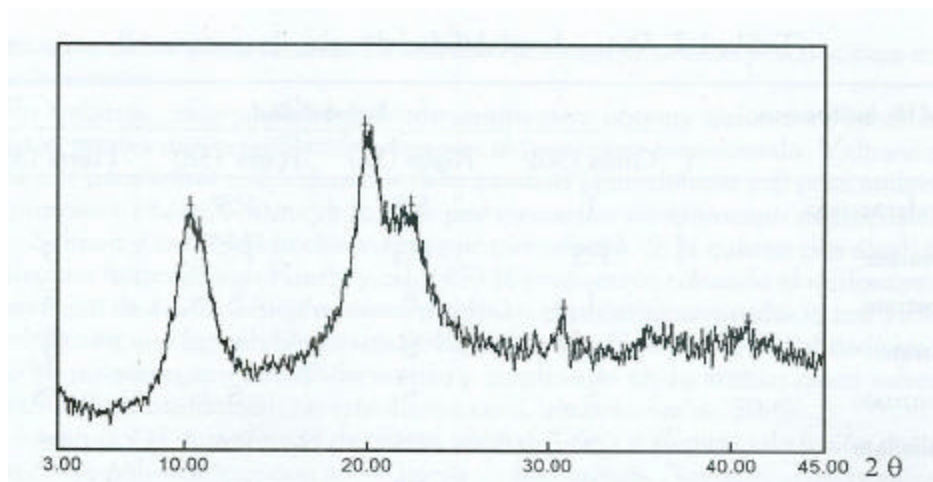
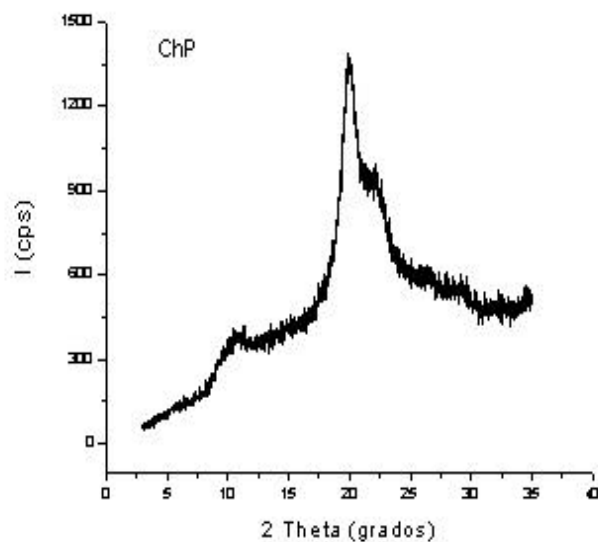
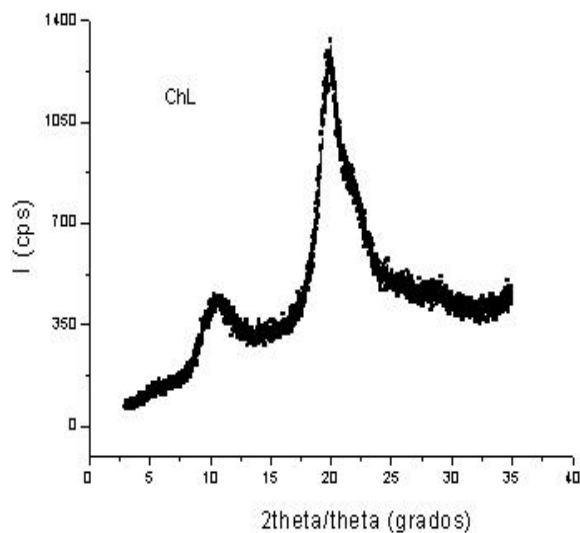


Gráfico 5.6.- Espectro de Difracción de Rayos X de Quitosano de Pota (ChP).



El espectro de difracción de rayos X (DRX) nos evidencian la presencia de 2 formas polimorfos del quitosano (α y β); se observa que el espectro de Quitosano presenta las difracciones a 9° y 19° de 2θ característicos del quitosano; el espectro DRX del quitosano de Pota (ChP) presenta las difracciones a 10.9 y 20 de 2θ .

Gráfico 5.7.- Espectro de Difracción de Rayos X de Quitosano de Langostino (ChL).



El espectro (DRX) de quitosano de Langostino (ChL) presenta 2 picos a 2θ : 11.5 y 21.2; la diferencia entre los picos a 2θ de ChP y ChL evidencian que se trata de 2 formas diferentes, de acuerdo a la literatura la β -quitina presenta picos característicos alrededor de 2θ : 8° y 19° en el espectro de (DRX) así mismo la α -quitina presenta picos alrededor de 2θ : 9° y 19°⁽⁸⁸⁾; vemos entre los dos una diferencia notoria en el pico a 2θ de la región amorfa: 8° y 9° respectivamente; correspondiendo ChP a la forma de β -quitina y ChL a la forma de α -quitina; la variación en el pico a 2θ se pueden atribuir a las condiciones en que se ha determinado el espectro (forma sólida o en forma de films), así mismo se observa que los valores están ligeramente desplazados a los valores teóricos debido a que los espectros de DRX han sido tomados en forma de films. Así mismo estos valores son susceptibles a la deacetilación.

Tabla 5.2.- Índice de Cristalinidad (Angulo $2q$) del pico amorfo y cristalino

<i>Muestra</i>	(%)Índice de Cristalinidad	Angulo $2q$ Región Amorfa	Angulo $2q$ Región Cristalina
ChP	64.7	10.9	20
ChQL	64.8	11.5	21.2
ChQL50kGy	—	10.8	19.8, 25.8, 29, 32.3

De los valores de (%) de Índice de Cristalinidad (IC) se observa que ChL presenta un mayor valor (64.8%) comparado con el (IC) de ChP que presenta un menor valor (64.7%). Así mismo se observa que ChL con un grado de deacetilación de 82% tiene mayor valor de IC comparado con ChP de grado de deacetilación de 88% tiene un menor valor de IC, los quitosanos con valores de grado de deacetilación > 82% resultan con IC menores; vemos que la forma de α -quitina presente en ChL es la que parece ser más estable lo cual se evidencia por su alto valor de IC, la forma β -quitina presente en ChP es menos estable lo cual se evidencia por el menor valor de IC⁽⁸⁹⁾.

Gráfico 5.8.- Micrografía SEM de Quitosano de Pota (1 mm)

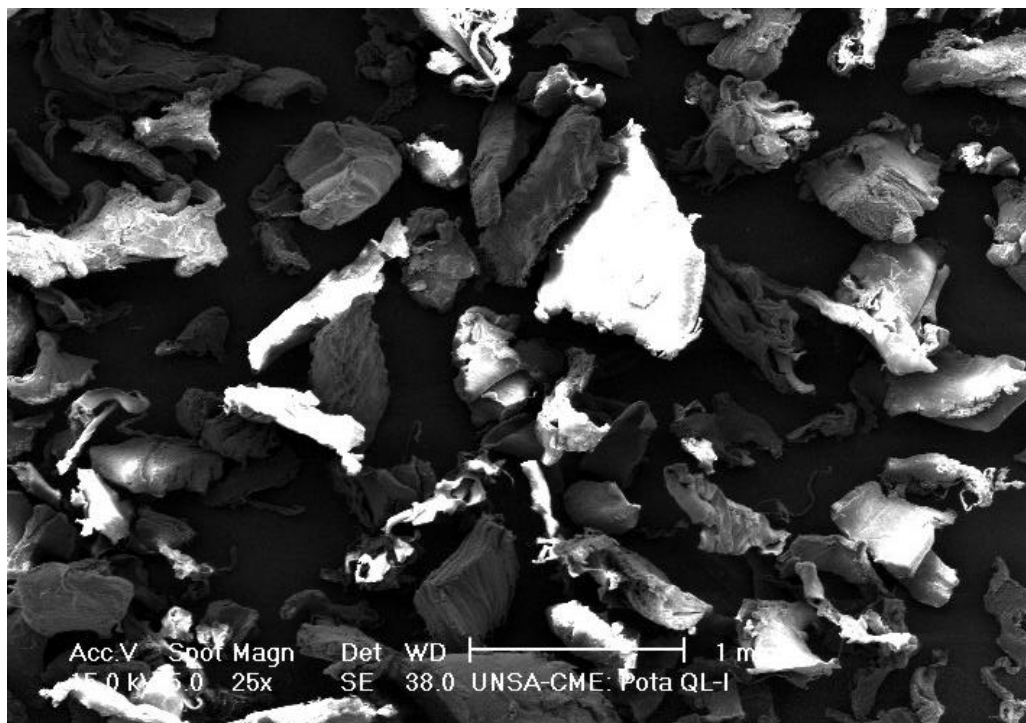


Gráfico 5.9.- Micrografía SEM de Quitosano de Pota (500 μ m)

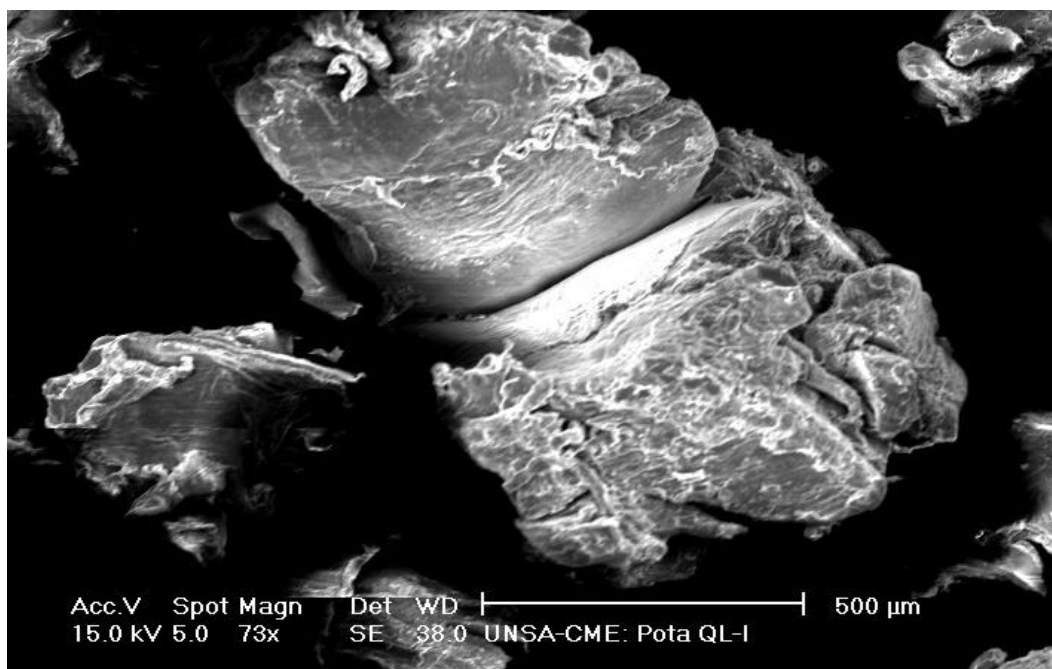


Gráfico 5.10.- Micrografía SEM de Quitosano de Pota (200 μ m)

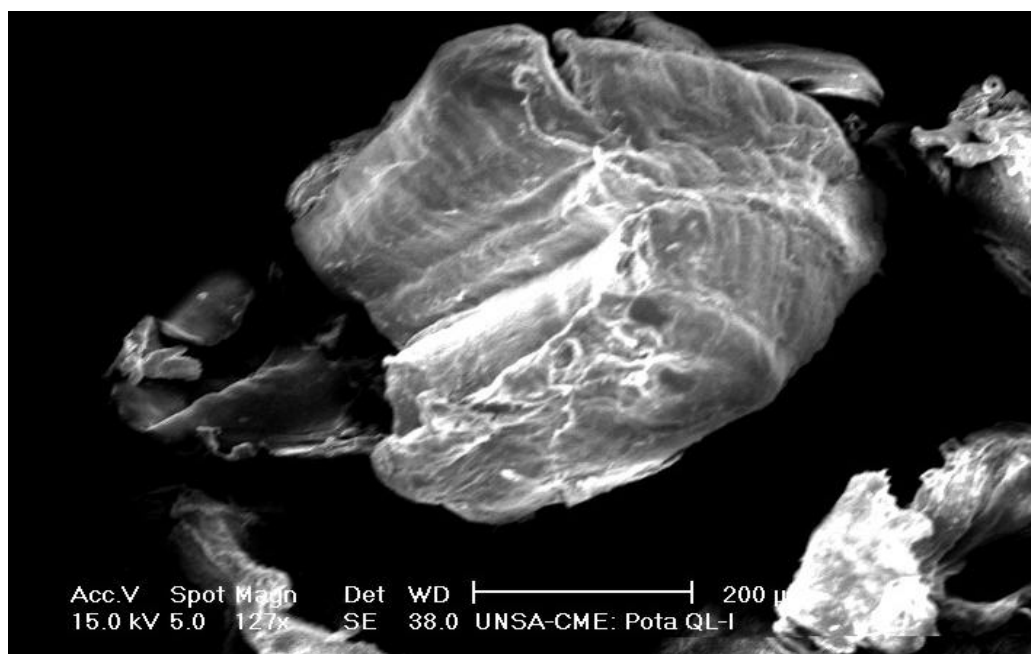
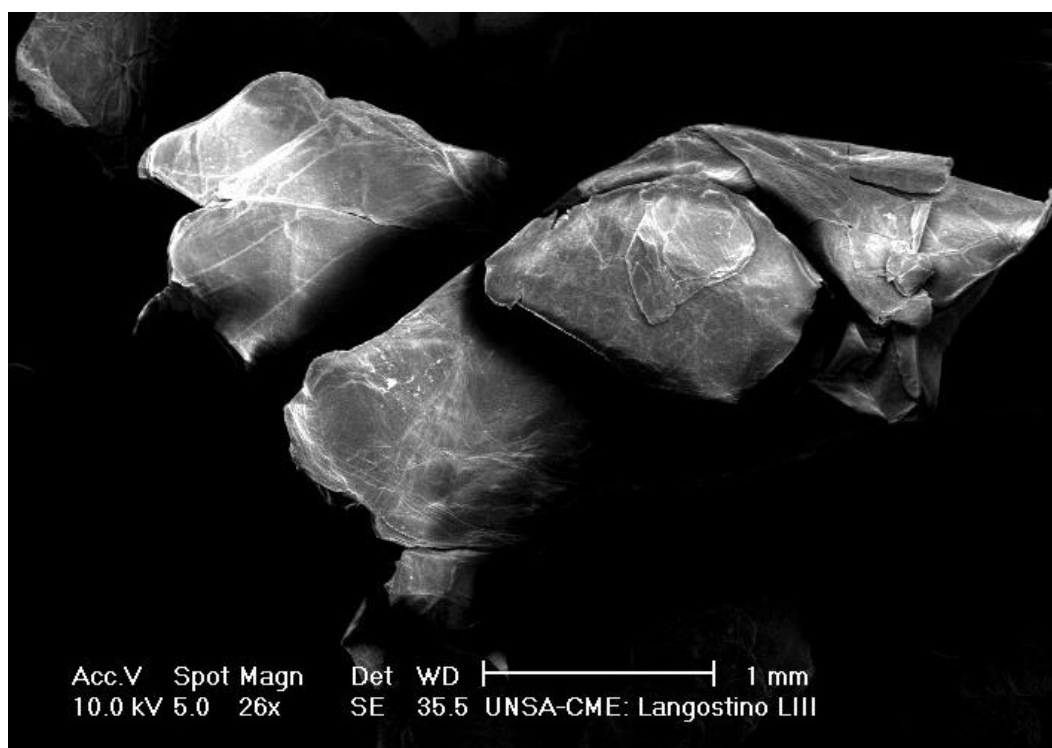


Gráfico 5.11.- Micrografía SEM de Quitosano de Langostino (1 mm)



De las micrografías obtenidas por SEM de la superficie de los films de quitosano; la micrografía a 1 mm (Gráfico 5.8) muestra la disposición en forma de hojuelas del quitosano de Pota, la micrografía a 500 y 200 μm (Gráfico 5.9 y 5.10) muestra una superficie porosa y forma gelatinosa del quitosano de Pota. Así mismo se comparó con las micrografía de 1 mm (Gráfico 5.11) de quitosano de Langostino en la cual se observa una disposición compacta de las partículas a diferencia del quitosano de Pota.

El quitosano de Pota (ChP) obtenido presenta un peso molecular y grado de deacetilación mayor en comparación con el quitosano de referencia (ChF). La diferencia entre las propiedades de los dos quitosanos es debido principalmente a las diferentes condiciones de reacción durante la obtención de quitosano así como las diferentes fuentes de quitina natural que se han empleado.

El peso molecular y el grupo amino del quitosano tienen una influencia en su actividad antibacterial.

En este trabajo se ha irradiado en diferentes etapas del proceso de obtención de quitosano de Pota (*Dosidicus gigas*).

Tabla 5.3.- Grado de Deacetilación obtenidos por los Métodos FTIR de Sabnis y Baxter de los Quitosanos.

<i>Muestra</i>	<i>% DD Método de Sabnis</i>	<i>%DD Método de Baxter</i>
ChF	86.7	84.1
ChP	88.1	85.4
ChPaI10	84.4	80.5
ChPaI15	84.4	80.5
ChPaI20	87.6	83.8
ChPaI30	88.4	83.0
ChPaI35	89.7	82.5
ChPaI40	90.2	87.4
ChPsI3	86.0	83.0
ChPaI3	88.3	83.5
ChPsI2	86.0	80.7
ChPaI2	87.7	83.3
ChPsI	85.0	80.1
ChPaI	87.1	83.7
ChPsI1	84.5	81.0
ChPaI1	86.4	82.8

Tabla 5.4.- Peso Molecular obtenido por el Método de Viscosidad Intrínseca de los Quitosanos.

<i>Muestra</i>	<i>[η] (mL/g)</i>	<i>Peso Molecular (KDa)</i>
ChF	1538	587
ChP	1843	673
ChPaI10	769	347
ChPaI15	746	339
ChPaI20	739	336
ChPaI30	734	335
ChPaI35	671	312
ChPaI40	625	296
ChPsI3	741	337
ChPaI3	731	333
ChPsI2	744	338
ChPaI2	733	334
ChPsI1	767	346
ChPaI1	724	331
ChPsI	887	386
ChPaI	717	329

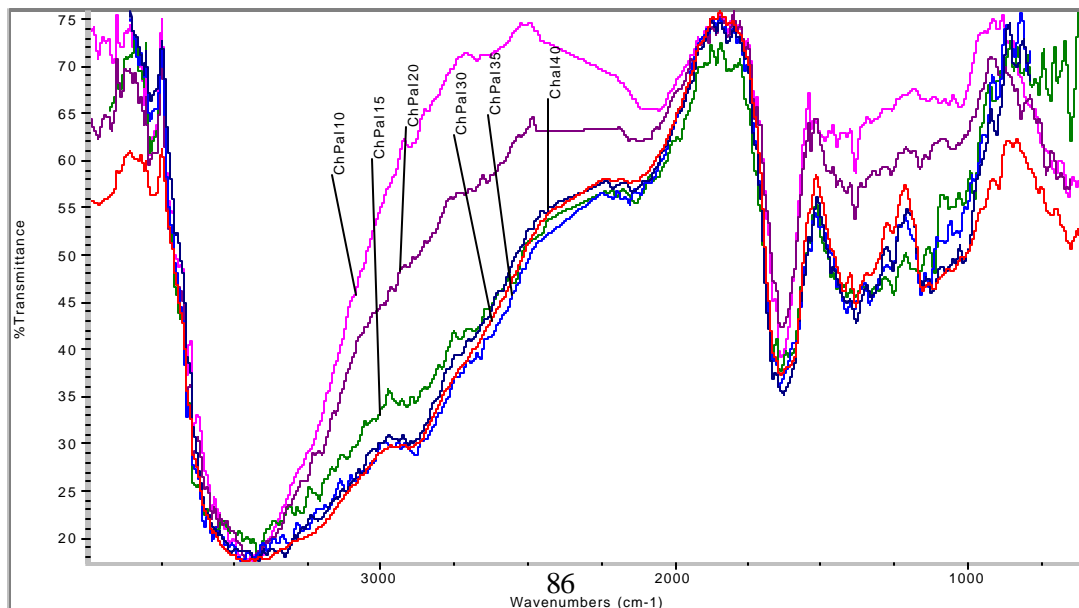
Empleando radiación gamma en diferentes etapas del proceso de acuerdo a la tabla 5.3 se obtienen grados de deacetilación que van de 90.16 (ChPaI40) a 84.41 (ChPaI10) % lo cual implica que el porcentaje de grupos amino libres que posee la cadena polimérica es manejable ya que se tienen quitosanos de alto y medio grado de deacetilación; así mismo los pesos moleculares de quitosanos irradiados de acuerdo a la tabla 5.4 varían de 386 (ChPsI) a 296 (ChPaI40) kDa, el peso molecular afecta la funcionalidad del quitosano una de las propiedades funcionales mas dependientes del Peso Molecular es la bioactividad; se observa que la disminución del peso molecular provoca la reducción de los coeficientes de

hinchamiento, así mismo el menor peso molecular beneficiara las aplicaciones biomédicas, por tanto la dosis de radiación influenciara obviamente en la actividad antibacterial así como en la degradación del quitosano.

En la tabla 5.3 se observa que el mayor grado de deacetilación (90.16 %) se obtiene cuando se irradia en medio acuoso las plumas de pota en una dosis de 40 kGy a este quitosano de acuerdo a la tabla 5.4 le corresponde un peso molecular de 296 kDa, lo cual implica que en medio acuoso esta dosis de radiación da lugar a una mayor disminución del peso molecular así mismo el tiempo de obtención de quitosano (1h y 15 min.) es mucho menor que los quitosanos obtenidos con otras dosis de radiación en las mismas condiciones (10, 15, 20, 30 y 35 kGy).

Se han realizado diferentes estudios referidos a la reducción del Peso Molecular empleando radiación gamma entre los mas importantes se tiene: Yoksan, R., Akashi, M., Miyata, M. y Chirachanchai, S.⁽⁹⁰⁾, los cuales realizaron un estudio sobre la dosis y condiciones optimas de radiación para producir quitosanos de bajo peso molecular que retengan la estructura química; Wasikiewiez J., Yoshii F., Nagasawa N., Wach R., Mitomo H.⁽⁹¹⁾, investigaron la degradación de quitosano y alginato de sodio empleando radiación gamma, sonoquímica y métodos ultravioleta; Nguyen Duy Lam y Tran Bang Diep⁽⁹²⁾ realizaron un estudio preliminar del tratamiento de radiación del quitosano para el incremento de la actividad antifungal probado en frutas.

Gráfico 5.12.- Espectros FTIR de Quitosanos de Rbta obtenido empleando radiación Gamma en diferentes dosis: 10, 15, 20, 30, 35 y 40 kGy, desde el Inicio del proceso.



En el espectro 5.12. Se pueden apreciar que los quitosanos irradiados (10-40 kGy) conservan las bandas a: 1654.75, 1592.59, 1314.20, 1150.60, 1079.64, 1032.23 y a 894.39 cm^{-1} .

ChPal10 presenta picos menos pronunciado a 1314.20 y a 894.39 cm^{-1} con respecto a las otras muestras irradiadas. Lo cual indica que la dosis de radiación no ha sido suficiente para obtener un rendimiento alto de quitosano.

La presencia de las bandas a 1654.75, 1592.59 y 1314.20 cm^{-1} en las muestras irradiadas indican que los grupos amina no cambian después de la degradación; así mismo la banda a 1150.60 cm^{-1} demuestran que el puente C-O-C se mantiene después de la degradación; las vibraciones a 1079.64 y 1032.23 cm^{-1} propias de la estructura piranósica no varían en las muestras irradiadas después de la degradación.

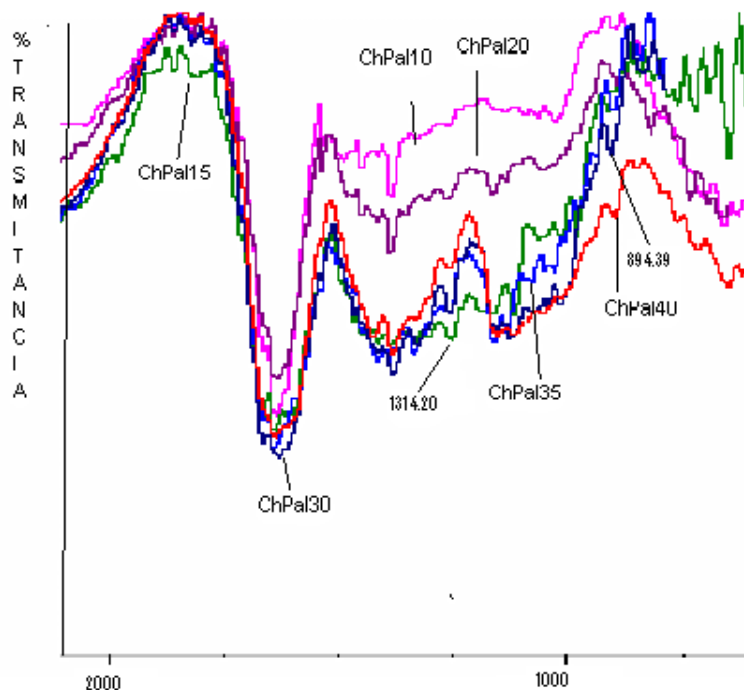


Gráfico 5.13.-Determinación del Peso Molecular del Quitosano ChPaI10, ChPaI15 y 1ChPaI20 empleando el Método de Viscosidad Intrínseca.

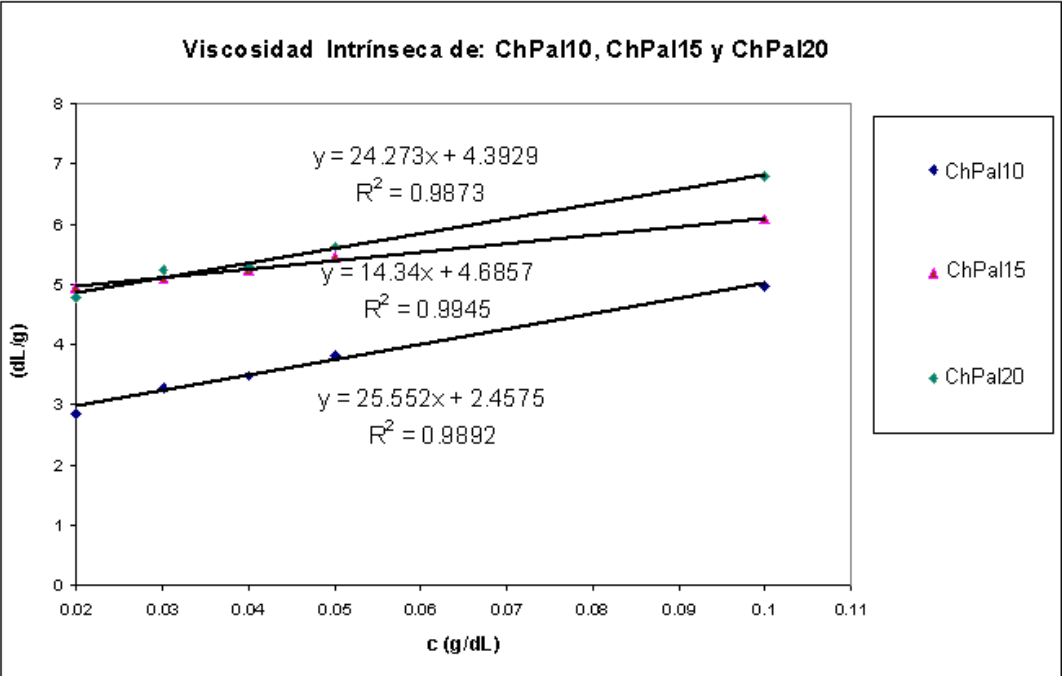
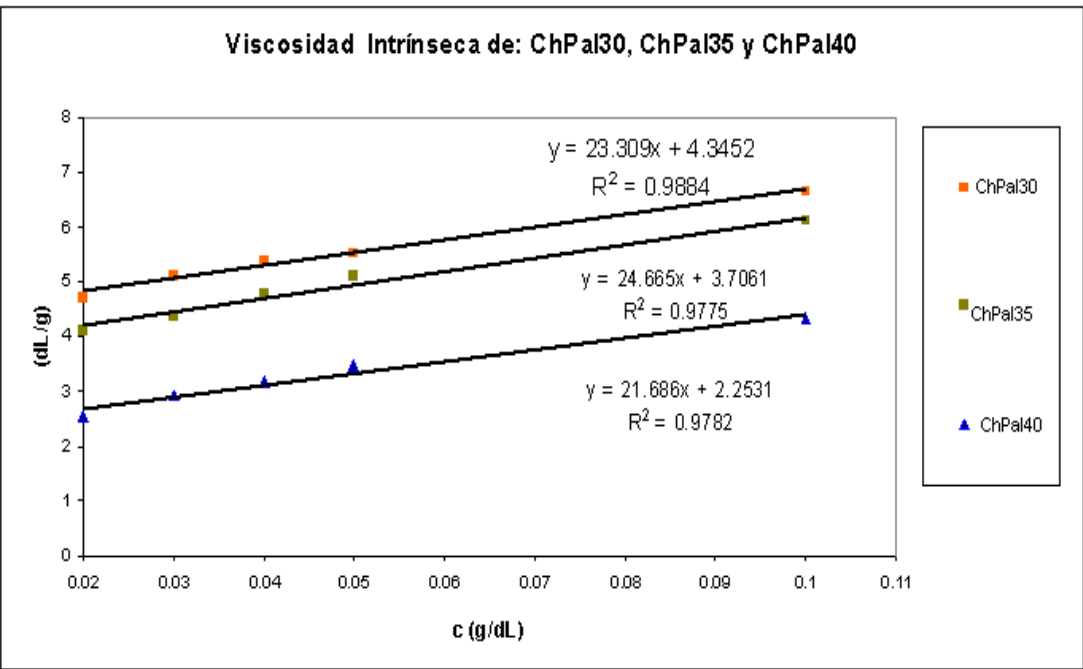
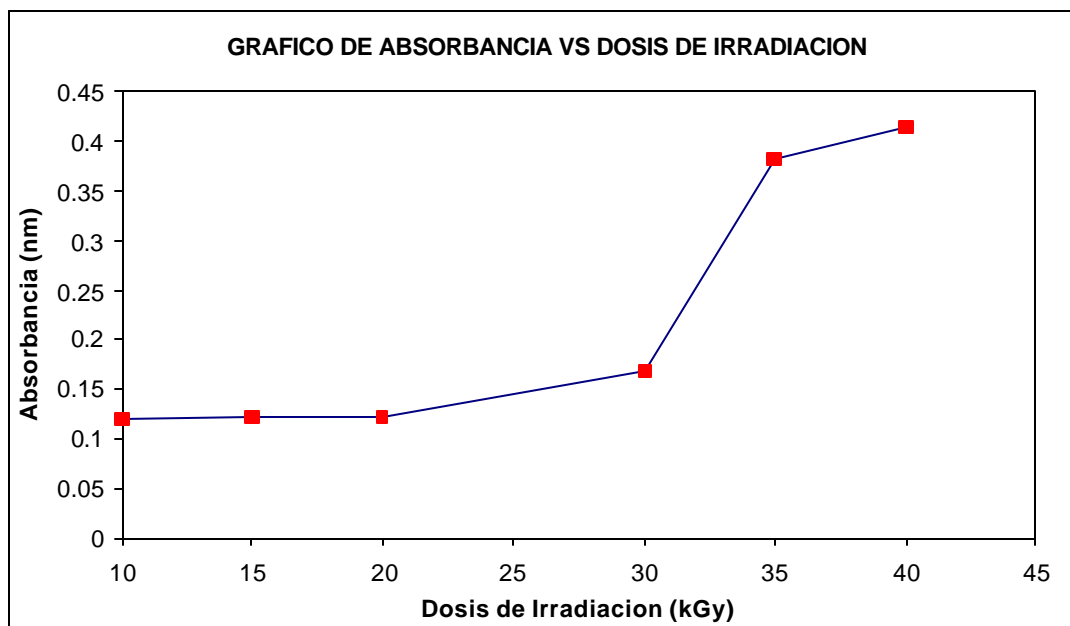


Gráfico 5.14.-Determinación del Peso Molecular del Quitosano ChPaI30, ChPaI35 y ChPaI40 empleando el Método de Viscosidad Intrínseca.



Del gráficas 5.13 y 5.14 se observa que hay una variación en el peso molecular para las muestras irradiadas estos cambios indican la degradación en la cadena del polímero. Por lo cual la disminución del Peso Molecular decrece continuamente a medida que se incrementa la dosis de la radiación gamma.

Gráfico 5.15.- Gráfico Absorbancia (287.23 nm) vs Dosis de Irradiación (kGy)



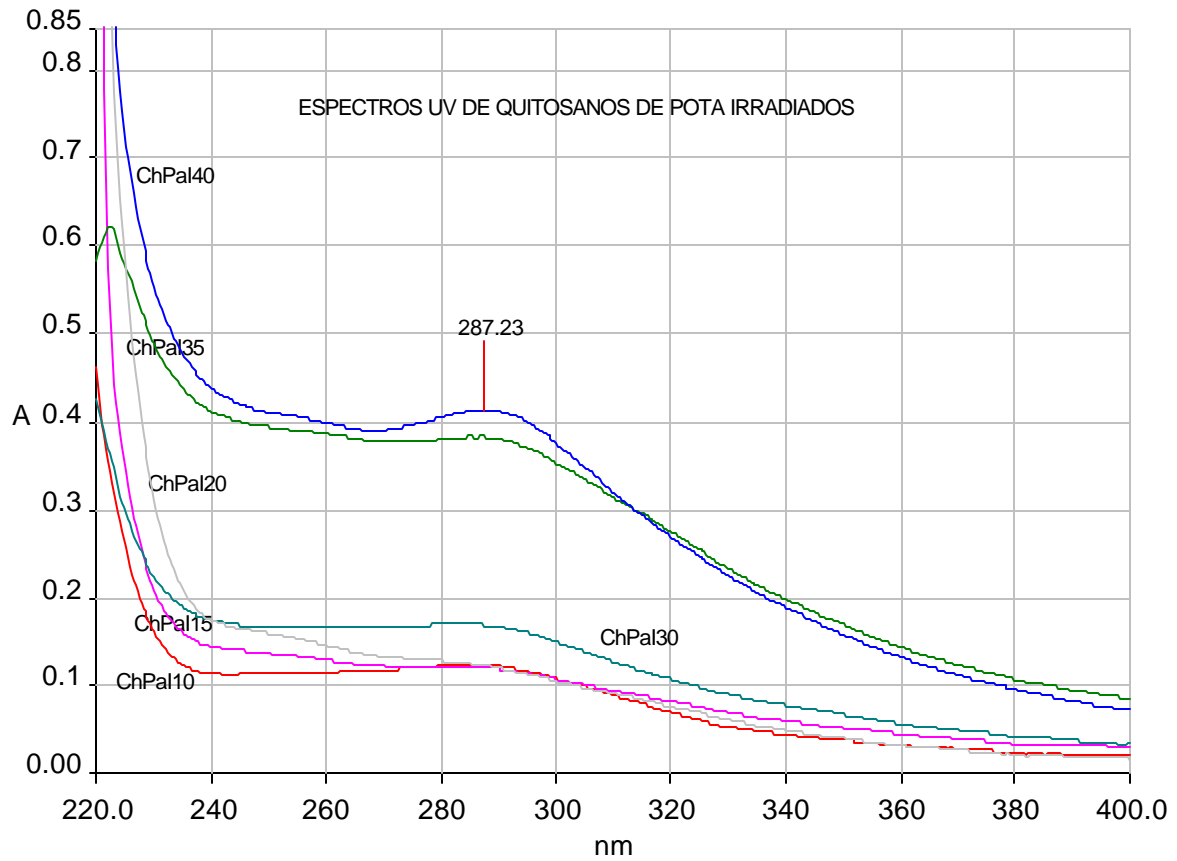
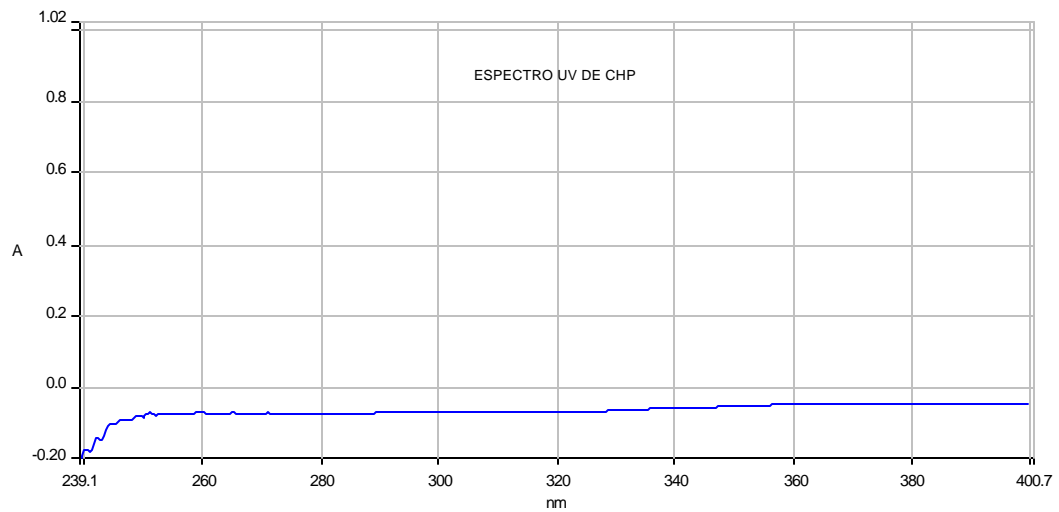
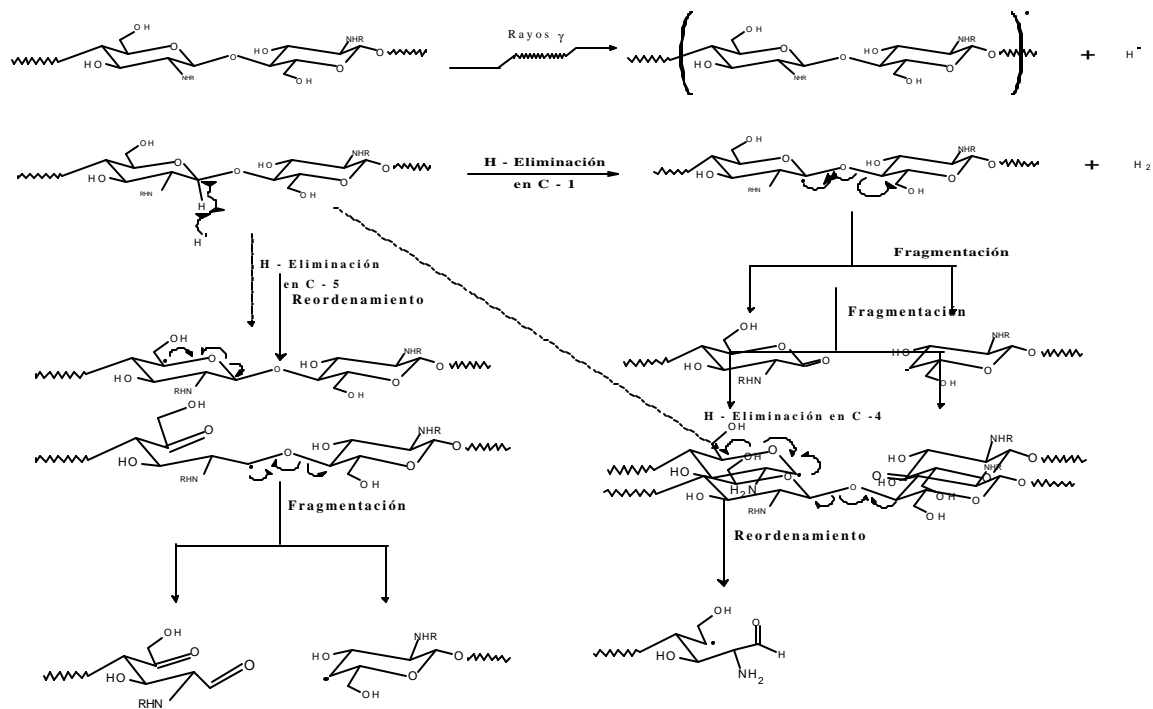


Gráfico 5.16.- Gráfico de espectros UV



De los resultados experimentales se observa que los quitosanos obtenidos empleando radiación gamma presentan una coloración de crema a marrón oscuro en el orden que se incrementa la dosis de radiación gamma; los quitosanos irradiados disueltos en ácido acético 0.1 M se presentan como cromóforos lo cual no se evidencia que los quitosanos sin irradiar que no presentan absorbancia en el rango UV, así en el gráfico 5.15 de espectros UV de quitosanos irradiados se observa que las muestras absorben a 287.23 nm, la aparición de estas bandas se asigna al grupo carbonilo, por otro lado se observa que el número de grupos carbonilo incrementa con el incremento de la dosis de radiación, indicando que después de la fragmentación y/o al cambio de lugar, la descomposición de radicales induce la formación del grupo carbonilo en la cadena terminal (esquema 1)⁽⁹³⁾. El número de grupos carbonilo depende de las condiciones en las cuales se ha llevado a cabo el proceso.

Esquema 1



Gráfica 5.17.- Espectro FTIR de Quitosano de Pota obtenido por irradiación a 25 kGy en el inicio del proceso en seco (ChPsi3) y en medio acuoso (ChPaI3).

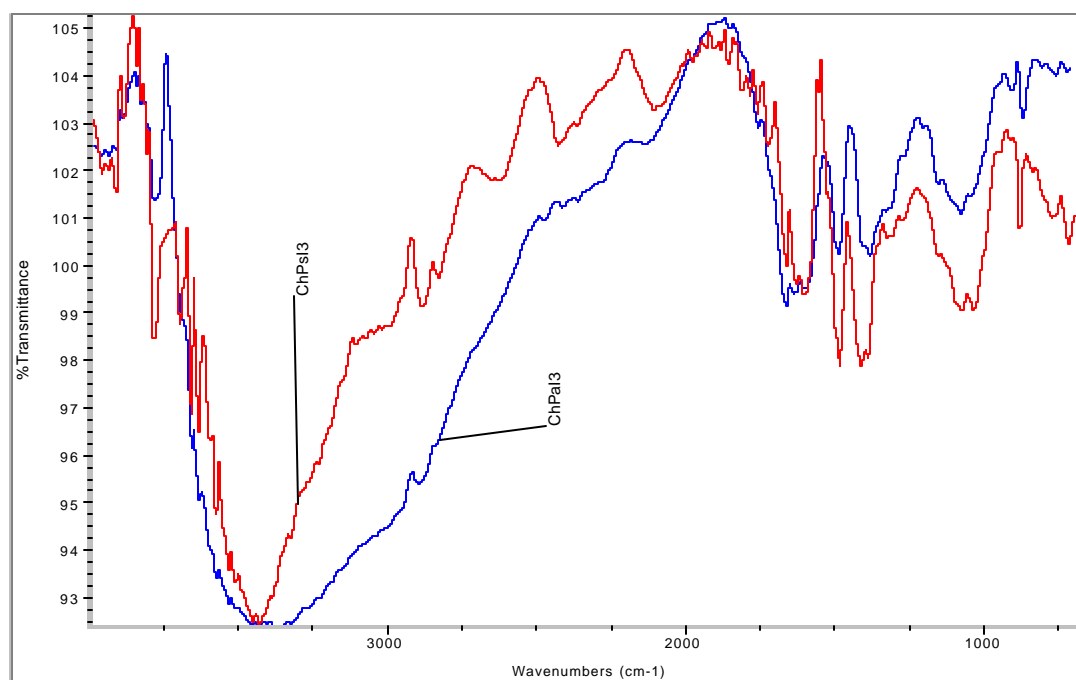
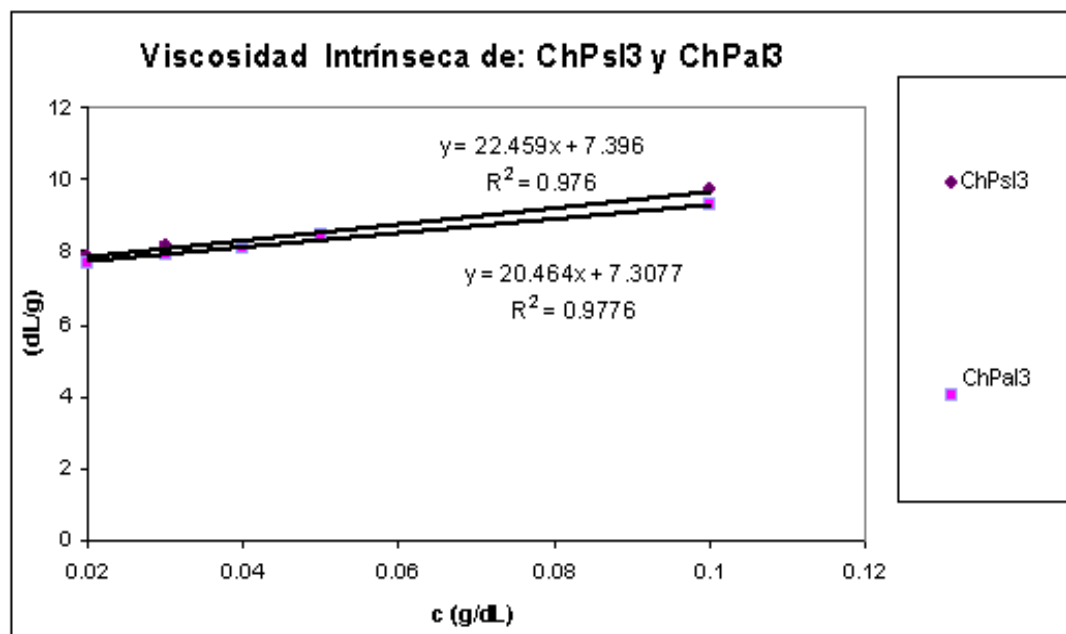


Gráfico 5.18.- Determinación del Peso Molecular del Quitosano ChPsi3 y ChPaI3 por Viscosidad Intrínseca.



Gráfica 5.19.- Espectro FTIR de Quitosano de Pota obtenido después del tratamiento ácido irradiado a 25 kGy en seco (ChPsi2) y en medio acuoso (ChPaI2).

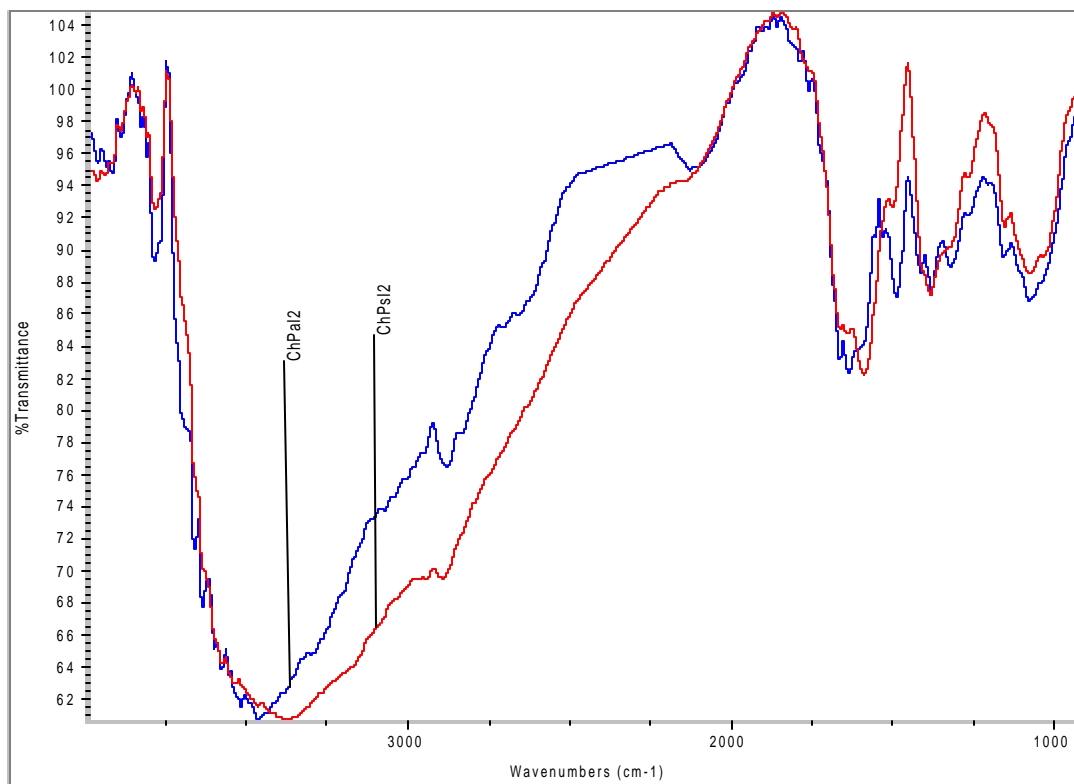
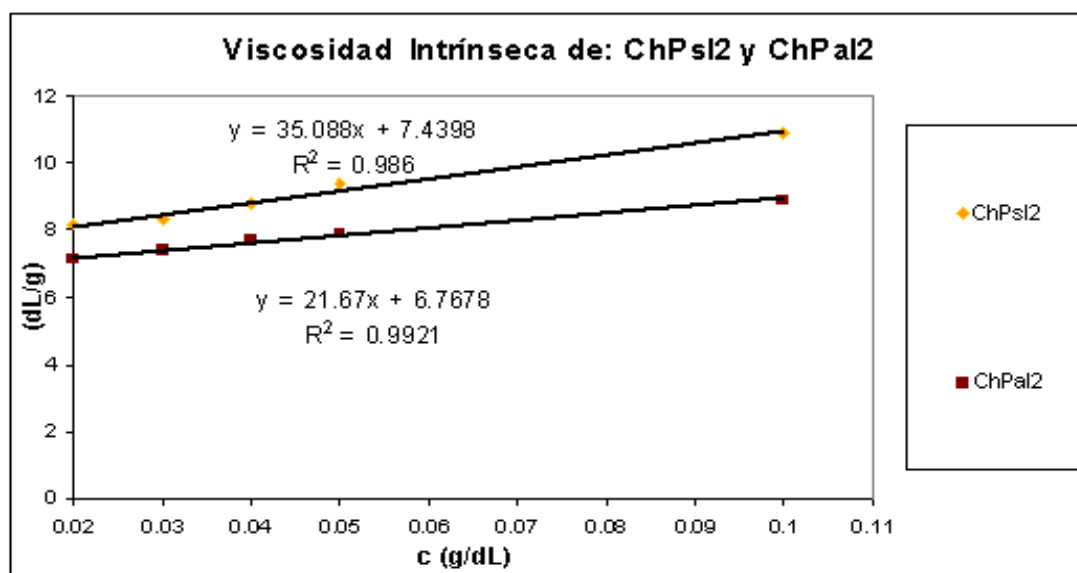
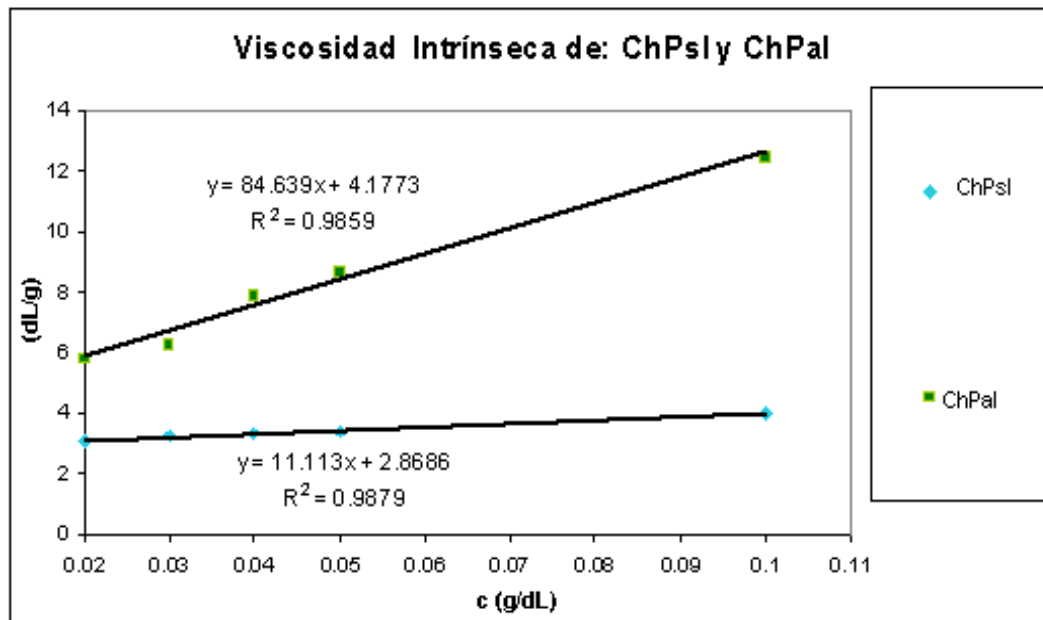


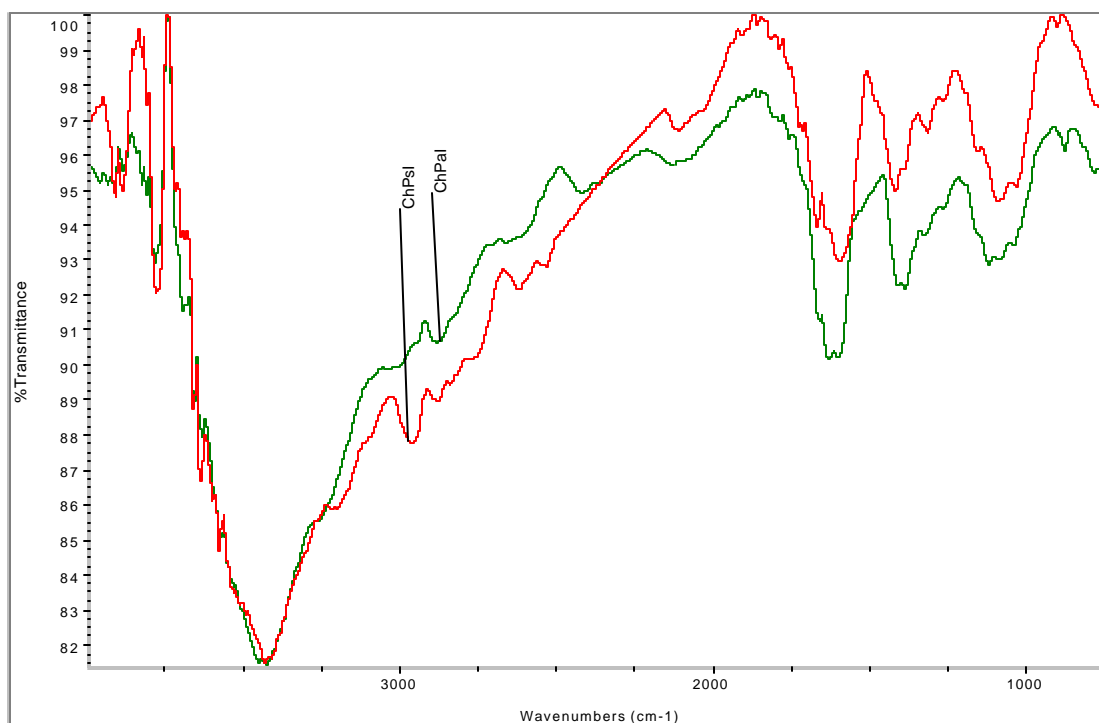
Gráfico 5.20.- Determinación del Peso Molecular del Quitosano ChPsi2 y ChPaI2 por Viscosidad Intrínseca. Viscosidad Intrínseca.



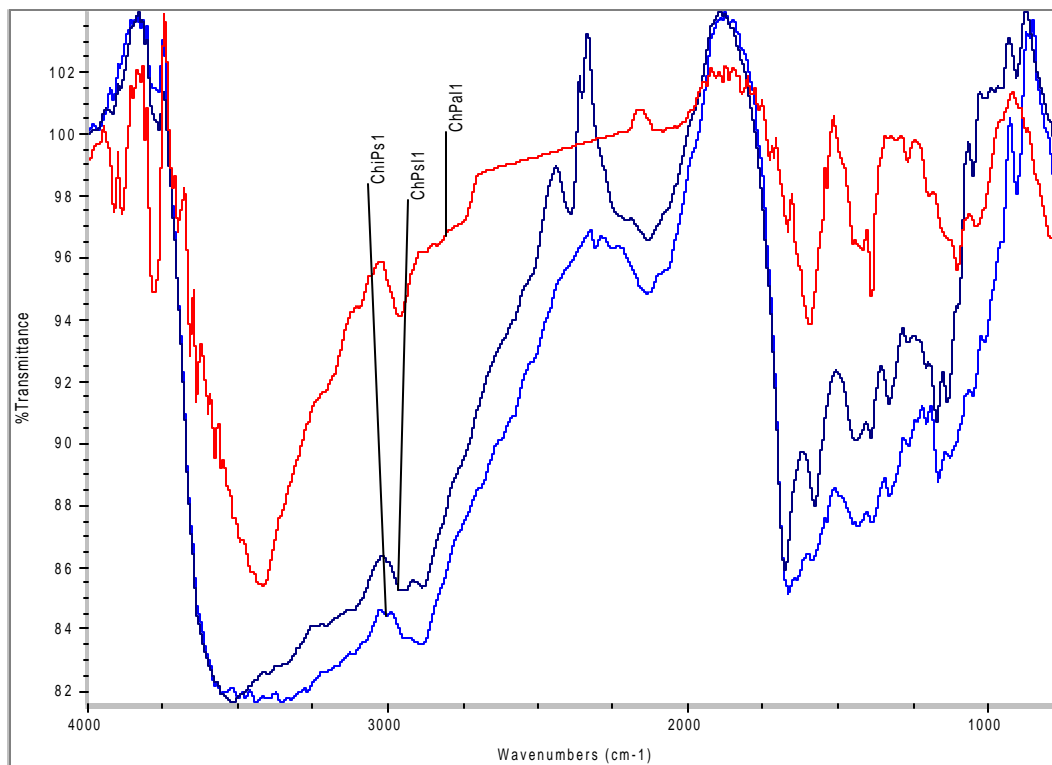
Gráfica 5.21.- Espectro FTIR de Quitosano de Pota obtenido empleando radiación gamma a 25 kGy antes de pasar a quitina en seco (ChPsI) y en medio acuoso (ChPaI)



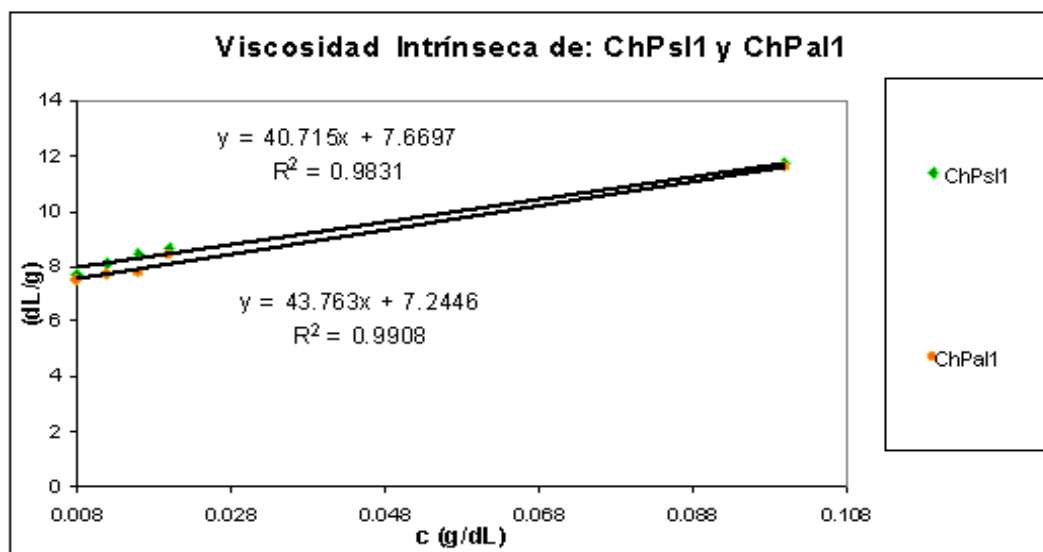
Gráfica 5.22.- - Gráfico: Determinación del Peso Molecular del Quitosano ChPsI y ChPaI por Viscosidad Intrínseca.



Gráfica 5.23.- Espectro FTIR de Quitina de Pota antes de irradiación a 25 kGy en seco (ChiPs1), después de la irradiación (ChPsI1) e irradiado en medio acuoso (ChPaI1).



Gráfica 5.24.- Determinación del Peso Molecular del Quitosano ChPsI1 y ChPaI1 por Viscosidad Intrínseca.



En el gráfico 5.21, 5.22, 5.23 y 5.24 se observa la variación en la determinación del Peso molecular de los quitosanos obtenidos en el estado sólido y en medio acuoso en las mismas condiciones; los espectros se diferencian principalmente por el efecto de la radiación en medio acuoso y en estado sólido debido a que presentan comportamientos diferentes así se observa que el quitosanos obtenidos en el estado sólido (ChPsI, ChPsII, ChPsI2 y ChPsI3,) evidencian menor degradación en comparación con los quitosanos obtenidos en medio acuoso (ChPaI, ChPaI1, ChPaI2, ChPaI3, ChPaI10, ChPaI15, ChPaI20, ChPaI30, ChPaI35 y ChPaI40), la mayor degradación de estos quitosanos se evidencia por la presencia de mayor cantidad de picos en comparación con los quitosanos obtenidos en el estado sólido.

En las tablas 5.3 y 5.4 se aprecia la mayor degradación de los quitosanos obtenidos en medio acuoso ya que estos presentan un mayor grado de deacetilación y un menor peso molecular comparado con los quitosanos obtenidos en estado sólido en las mismas condiciones.

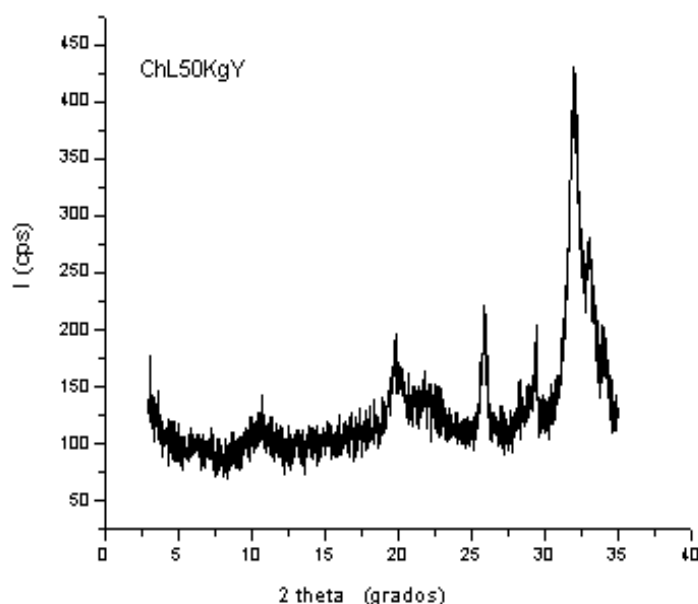
En el grafico 5.23 se evidencia que el quitosano ChPsII presenta un bajo rendimiento ya que en el espectro FTIR se evidencia los picos característicos de quitina.

Tabla 5.5.- Características de los Quitosanos obtenidos empleando radiación gamma.

Quitina	Tiempo de Obtención de quitosano	Quitosano Obtenido	Coloración
ChiPaI10	2h y 25 min.	ChPaI10	Crema claro
ChiPaI15	2h y 10 min.	ChPaI15	Crema claro
ChiPaI20	1h y 45 min.	ChPaI20	Crema claro
ChiPaI30	1h y 30 min.	ChPaI30	Crema claro
ChiPaI35	1h y 20 min.	ChPaI35	Crema oscuro
ChiPaI40	1h y 15 min.	ChPaI40	Crema oscuro
PsI	1h y 35 min.	ChPsI3	Crema claro
PaI	1h y 20 min.	ChPaI3	Crema claro
PacsI	1h y 40 min.	ChPsI2	Crema amarillento
Pacal	1h y 30 min.	ChPaI2	Crema oscuro
ChiPsI	3h.	ChPsI	Amarillo oscuro
ChiPaI	1h y 50 min.	ChPaI	Marrón amarillento
ChiPsI1	1h y 30 min.	ChPsI1	Crema claro
ChiPaI1	1h.	ChPaI1	Crema claro

El tiempo de obtención de los quitosanos y la variación del color empleando radiación gamma está relacionado principalmente con la degradación de los mismos en función de el estado en el cual se encuentran al ser irradiados así de la tabla 5.5 se observa que ChPaI40 requiere menos tiempo esto es atribuido principalmente a la dosis de radiación y a que en medio acuoso la degradación es mayor; de igual manera ChPaI3, ChPaI2, ChPaI y ChPaI1 requieren menor tiempo y presentan también de acuerdo a la tabla 5.3 y 5.4 mayor grado de deacetilación y menor peso molecular en comparación de las muestras irradiadas en las mismas condiciones en estado sólido (ChPsI3, ChPsI2, ChPsI, ChPsI1).

Gráfica 5.25.- Espectro de Difracción de Rayos X de Quitosano de Langostino irradiado a 50 kGy



Se ha obtenido el espectro DRX (gráfico 5.25) de una muestra de ChL irradiado por radiación gamma a 50 kGy en estado sólido, se irradió a 50 kGy debido a que en este valor hay una disminución significativa del peso molecular para verificar la degradación en esta dosis, se observa que del espectro DRX se obtienen los siguientes picos a 2θ : 10.8, 19.8, 25.8, 29 y 32.3 (tabla 5.2) con lo cual se deduce que ha ocurrido una degradación en

la región cristalina así deducimos que empleando una radiación a 50 kGy no se conserva la región cristalina.

Tabla 5.6.- Porcentaje del grado de hinchamiento después de 2880 minutos de 2P8Q, 4P6Q, 6P4Q, 8P2Q y 10P0Q

<i>Muestra</i>	Tiempo (min.)	(%) Hinchamiento
2 P8Q	2880	99.6
4 P6Q	2880	99.7
6P4Q	2880	100.0
8P2Q	2880	99.8
10P0Q	2880	99.7

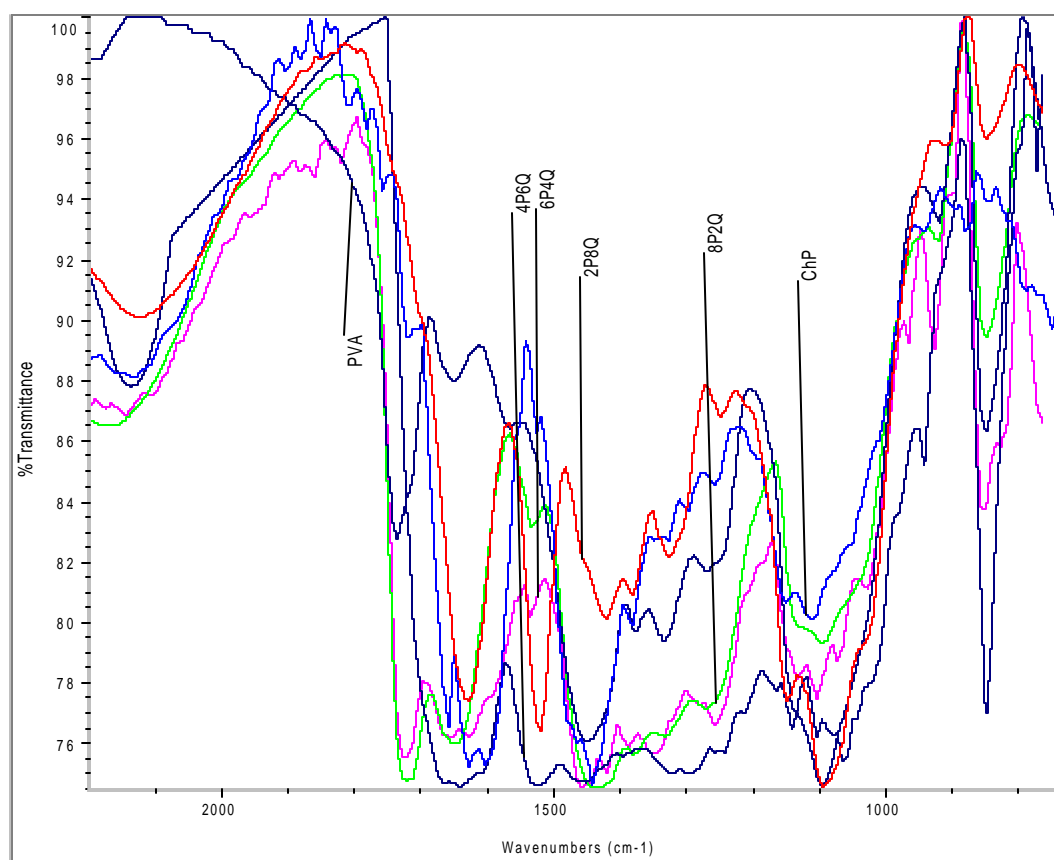
En este trabajo se ha obtenido hidrogeles de PVA/Quitosano de Pota (PVA/ChP) empleando radiación gamma en una dosis de 10 kGy; se empleo esta dosis de acuerdo a los trabajos presentados en la literatura para hidrogeles de PVA/Quitosano de Langostino (PVA/ChL)⁽⁹⁴⁾, se observa que los grados de hinchamiento (tabla 5.6) dependen de la temperatura, la fuerza iónica del medio y la proporción del quitosano presente en el hidrogel⁽⁹⁵⁾. Se conoce que tanto el quitosano como el PVA se degradan por efecto de la radiación gamma.

Se ha irradiado la mezcla PVA/ChP en medio acuoso debido a que el quitosano se encuentra en su forma protonada, con cargas positivas sobre los grupos amino. Se observa la presencia de H_3O^+ y agua, el proceso inicial durante la irradiación debe ser la radiólisis del agua por ser la especie más abundante, produciendo radicales H^\bullet y OH^\bullet según la ecuación (7). Ambos radicales pueden provocar la degradación del quitosano de manera similar que en el estado sólido pero en medio acuoso es mucho más rápido y requiere dosis bajas debido a la facilidad con que se produce la radiólisis del agua. En el caso del PVA irradiado a 10 kGy es posible que la relativa alta concentración de PVA favorezca la

interacción entre las cadenas, gracias a los puentes de hidrogeno haciendo que estén próximas entre ellas. Esta proximidad incrementa la probabilidad de reacción entre el radical que se forma en una cadena con el centro sensible de otra cadena logrando un entrecruzamiento químico.

En el caso de las mezclas de PVA/ChP se esperaría según lo observado que los procesos de disminución de peso molecular del quitosano y formación de hidrogel de PVA se dieran en forma paralela. De acuerdo a la literatura para dosis de 10 kGy el quitosano debería estar completamente degradado y ser completamente soluble. De otro lado el PVA tendría cierta tendencia a formar hidrogeles. Sin embargo las deferentes mezclas de PVA/ChP gelificarón todas a 10 kGy de irradiación. Esto implica que los radicales formados por la radiólisis del agua durante la radiación gamma promueven el entrecruzamiento entre las cadenas⁽⁹⁶⁾. Todos los hidrogeles obtenidos presentan porcentajes de hinchamiento en el orden de >90% de acuerdo a la tabla 5.6.

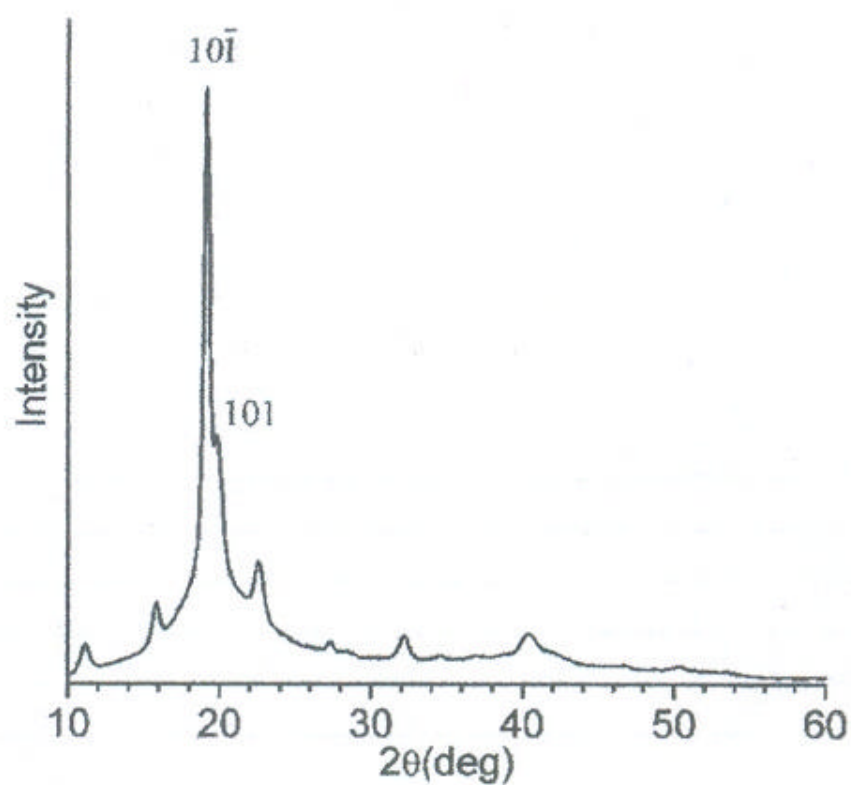
Gráfica 5.26.- Espectro FTIR de PVA, ChP, 2P8Q, 4P6Q, 6P8Q, 8P2Q



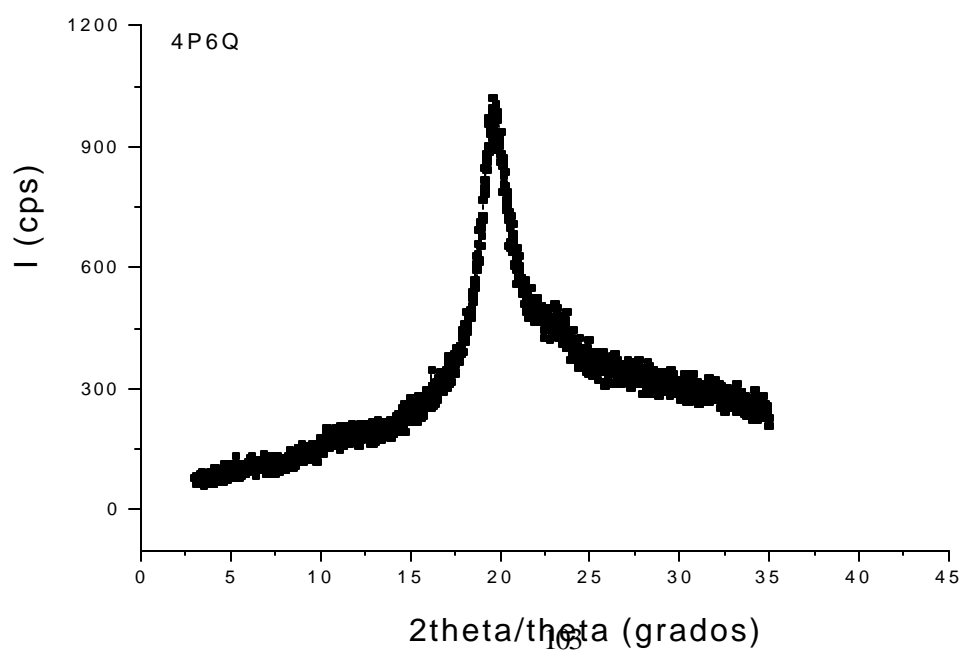
El espectro FTIR de los hidrogeles comparados con la del quitosano de Pota y el PVA (Gráfico 5.26) se observa que ambos no han sufrido modificaciones significativas durante la irradiación gamma, así mismo constituye una evidencia del entrecruzamiento la textura gelatinosa. Los hidrogeles obtenidos con las diferentes mezclas de quitosano-PVA presentan propiedades mecánicas diferentes a las presentadas por el hidrogel puro de PVA, ya que este último es poco flexible y con bajo poder absorbente, en cambio los hidrogeles obtenidos de las mezclas tienen buena flexibilidad y buen poder absorbente. El PVA solo no forma hidrogeles, este hecho nos indica que el mecanismo de reacción de los radicales formados durante la radiólisis no es igual al que se observa para los sistemas de quitosano y PVA aislados. Por lo tanto la formación de redes tridimensionales solamente a base de cadenas de PVA no es posible al menos que la presencia de cadenas de quitosano ayude a estabilizar esta red.

Antes de la irradiación los grupos funcionales del quitosano interactúan con los del PVA por medio de puentes de hidrógeno entre los grupos $-NH_2$ y $-OH$ del quitosano con los $-OH$ del PVA manteniendo cerca ambas cadenas. Cuando se irradia la mezcla en solución, los radicales producen en el PVA la abstracción del H del carbono portador del grupo OH, mientras que en el quitosano se produciría la abstracción del H en los carbonos C(1), C(4) o C(5). Estos radicales podrían unirse entre ellos formando un enlace covalente entre las cadenas. La proximidad de las cadenas haría de que los radicales formados sigan esta vía y no produzcan la degradación del quitosano.

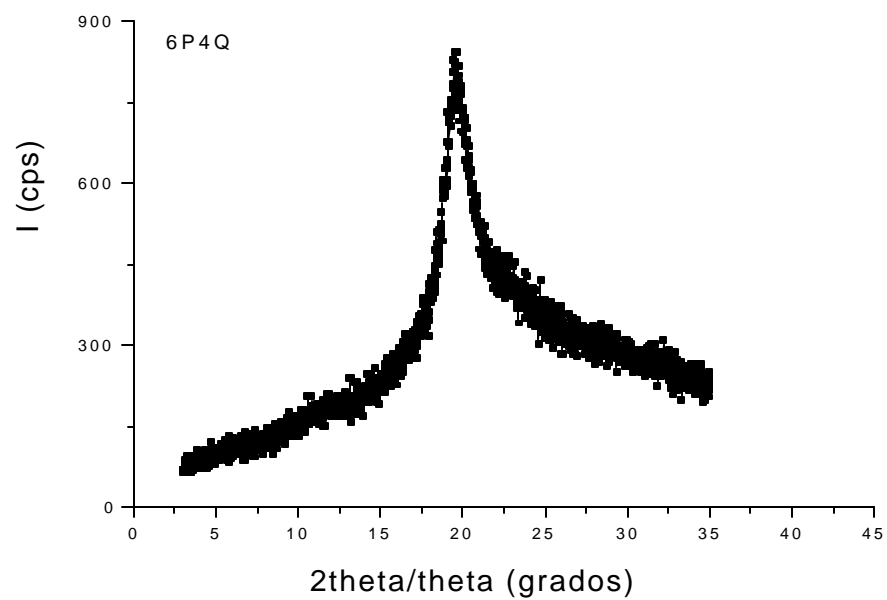
Gráfica 5.27.- Espectro de Difracción de Rayos X de PVA⁽⁹⁶⁾



Gráfica 5.28.- Espectro de Difracción de Rayos X del Hidrogel 4P6Q.



Gráfica 5.29.- Espectro de Difracción de Rayos X del Hidrogel 6P4Q.



Gráfica 5.30.- Espectro de Difracción de Rayos X del Hidrogel 10P0Q.

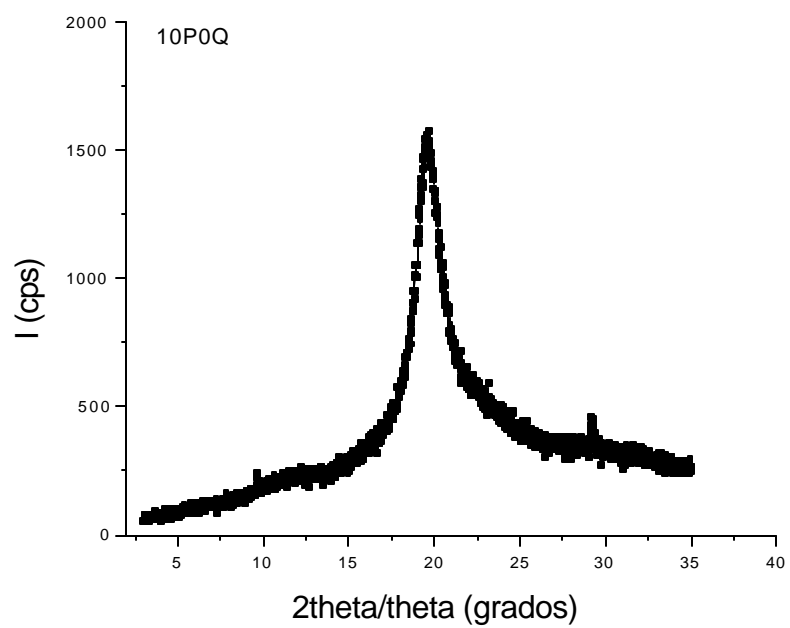


Tabla 5.6.- Picos de la región amorfa y cristalina de 4P6Q, 6P4Q y 10P0Q.

<i>Muestra</i>	Angulo 2q Región Cristalina
PVA	19.4
4P6Q	21
6P4Q	20.5
10P0Q	19.6

Los espectros de DRX de los hidrogeles 4P6Q, 6P4Q y 10P0Q (Gráfica 5.28, 5.29 y 5.30) muestran que no se muestra una región amorfa definida lo cual se puede atribuir a una influencia del PVA; así vemos que en el espectro de DRX de 10 P0Q (Gráfica 5.30) el valor del pico a 2θ en la región cristalina es de 19.64 lo cual es similar al valor del pico a 2θ en la región cristalina es de 19.4 de un film de PVA (Gráfica 5.27) , lo cual evidencia que solo hay una contribución del PVA; así mismo en los espectros de DRX de 6P4Q y 4P6Q (Gráfica 5.28 y 5.29) se observa que el valor del pico a 2θ en la región cristalina es de 20.5 y 21 respectivamente lo cual evidencia que existe una contribución en la región cristalina del quitosano.

VI.- CONCLUSIONES

- Se ha obtenido β -quitina, empleando plumas de Pota "*Dosidicus gigas*".
- Se ha obtenido quitosano de Pota "*Dosidicus gigas*" por el método convencional, el cual presenta menor solubilidad, mayor hinchamiento, mayor peso molecular y mayor grado de deacetilación que el estándar de quitosano obtenido a partir de la caparazón de cangrejos.
- Empleando radiación gamma se ha logrado disminuir hasta en 5 veces menos el tiempo de obtención de quitosano de Pota "*Dosidicus gigas*".
- El mayor grado de deacetilación se obtuvo al irradiar en medio acuoso las plumas de Pota en una dosis de 40 kGy, lo cual da lugar a una mayor disminución del peso molecular. Así mismo el tiempo de obtención de los quitosanos es mucho menor en comparación con otras dosis menores de radiación en las mismas condiciones.
- Para la determinación del Grado de deacetilación de los quitosanos se ha empleado la técnica de Espectroscopia FTIR, debido principalmente a que es una técnica de fácil manejo, no es destructiva para la muestra, implica menor gasto y los resultados son reproducibles.
- La degradación después de emplear radiación gamma está acompañada con cambio de color del quitosano analizado; una alta degradación se evidencia por una coloración marrón del quitosano.
- El quitosano de Pota con un Peso Molecular de 673 KDa fue exitosamente degradado hasta 296 KDa. Conservando su estructura primaria, usando condiciones simples de dispersión en agua y una dosis de irradiación de 40 kGy.
- La retención de la estructura de quitosano después de la irradiación gamma hace posible producir quitosanos de bajo peso molecular.

- Al analizar los valores del porcentaje de Índice de Cristalinidad (IC) se observa que ChP tieneun mayor valor (64.94%) en comparación con el (IC) de ChL que presenta un menor valor (63.57%).
- A una dosis de irradiación de 50 kGy existe una disminución significativa del peso molecular, asi mismo en el espectro DRX se observa que ha ocurrido una degradación en la región cristalina.
- Los grados de hinchamiento dependen de la temperatura, la fuerza iónica del medio y la proporción del quitosano presente en el hidrogel.
- Las diferentes mezclas de PVA/ChP gelificarón todas a 10 kGy de irradiación. Esto implica que los radicales formados por la radiólisis del agua durante la radiación gamma promueven el entrecruzamiento entre las cadenas.

VII.- RECOMENDACIONES

- Se debe de controlar el tamaño de partícula en el proceso de obtención de quitosano de pota, ya que influye en el tiempo de reacción.
- En las determinaciones del grado de deacetilación por Espectroscopia FTIR se debe tener sumo cuidado de que el soporte de KBr este completamente libre de agua, para ello debe de secarse previamente 1h a 110 °C.
- La muestra debido a su naturaleza higroscópica debe de secarse al vacío previamente por 2 h antes de su determinación.
- En la determinación del espectro FTIR del quitosano de Pota (*Dosidicus gigas*), se debe de tener sumo cuidado en la determinación de la línea de referencia ya que es determinante para los resultados en el grado de deacetilación.
- Después del tratamiento básico para obtener quitosano, para alcanzar mas rápidamente al pH neutro se recomienda emplear agua tibia para remover rápidamente la soda remanente.
- Para quitosanos con grado de deacetilación bajos lo cual da lugar a que disminuye la solubilidad se recomienda emplear la técnica de Espectroscopia IR ya que la técnica de Titulación es menos aplicable en este caso.
- Se debe de controlar la concentración de hidróxido de sodio que se emplea en el proceso final de obtención de quitosano ya que esta relacionado directamente con un alto o un bajo grado de deacetilación del quitosano que se obtiene.
- En la determinación del espectro de Difracción de Rayos X (DRX) se recomienda preparar la muestra en film para poder obtener un espectro de buena resolución que nos permita elucidar las fases del biopolímero.

- Se debe seleccionar la dosis adecuada de radiación gamma en el proceso de obtención de hidrogeles de PVA/Quitosano de Pota para conseguir el entrecruzamiento.
- Se debe de caracterizar los hidrogeles principalmente por su grado de hinchamiento ya que nos indican la capacidad adsorbente del hidrogel.

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

1. CYTED IV.14, *Quitina y Quitosano, obtención caracterización y aplicación*, 1 ed., (2004) 22, Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
2. Chapiro, “*Polymer irradiation: past, present and future*”, Radiation Phys. Chem., 63 (2002), 207.
3. M. Széliga, C. Bregni, *Hidrogeles Obtenidos por Radiación Gamma como Sistemas de Liberación Sostenida de Flutamida*, Rev. Iberoamer. Polím., 2, (2001), 1.
4. Y. Nho, K. Park, *Preparation and properties of PVA/PVP hydrogels containing chitosan by radiation*, J. Appl. Polym. Sci., 85 (2002), 1787.
5. D. Meinhold, R. Schweiss, S. Zschoche, A. Janke, A. Baier, F. Simon, H. Dorschner, C.
6. Wemer, *Hydrogel Characteristic of electron-beam-immobilized poly(vinylpyrrolidone) films on poly(ethylene terephthalate) supports*, Langmuir, 20, (2004), 396.
7. L. Bourke, M. Al-Khalili, T. Briggs, B. Michniak, J. Kohn, and L. Poole-Warren, *A Photo-Crosslinked Poly(vinyl Alcohol) Hydrogel Growth Factor Release Vehicle for Wound Healing Applications*, AAPS Pharm. Sci., 5, (2003), 1.
8. D. García, J. Escobar, N. Bocourt, N. Bada, D. Zaldívar, I. Katime, *Influencia del Agente Entrecruzante y la composición en Hidrogeles de poli(ácido itacónico-ácido metacrílico)*, Rev. Iberoamer. Polím., 5, (2004), 17.

9. Duy Lam N., Bang Diep T., *A preliminary study on radiation treatment of Chitosan for Enhancement of Antifungal Activity tested on Fruit-Spoiling strains*, Nuclear Science and Technology, Vol.2, No 2 (2003), 54-60.
10. H. Braconnot., *Sur la Nature des Champignons*, Ann., Chi. Phys.79 (1811) 265-304.
11. CYTED IV.14, *Quitina y Quitosano, obtención caracterización y aplicación*, 1 ed., (2004) 29, Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
12. CYTED IV.14, *Quitina y Quitosano, obtención caracterización y aplicación*, 1 ed., (2004) 105, Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
13. CYTED IV.14, *Quitina y Quitosano, obtención caracterización y aplicación*, 1 ed., (2004) 109-111 Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
14. <http://www.imarpe.gob.pe/paita/pota.html>
15. <http://www.produce.gob.pe/>
16. <http://www.imarpe.gob.pe/paita/pota.html>
17. CYTED IV.14, *Quitina y Quitosano, obtención caracterización y aplicación*, 1 ed., (2004) 112 Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
18. CYTED IV.14, *Quitina y Quitosano, obtención caracterización y aplicación*, 1 ed., (2004) 113 Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

19. CYTED IV.14, *Quitina y Quitosano, obtención caracterización y aplicación*, 1 ed., (2004) 36 Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
20. K.M. Rudall y W. Kenchington., *Biol. Rev.* 49 (1973), 597.
21. M. Vincendon, J. C. Roux, L. Chanzy, S. Tanner y P. Belton., *Chitin and Chitosan*, (1989), 437, Elsevier Londres.
22. CYTED IV.14, *Quitina y Quitosano, obtención caracterización y aplicación*, 1 ed., (2004) 38 Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
23. CYTED IV.14, *Quitina y Quitosano, obtención caracterización y aplicación*, 1 ed., (2004) 38 Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
24. G.A.F. Roberts. *Chitin Chemistry*, Macmillan (1992), 249, Londres.
25. P. Gross, E. Konrad y H. Mager, *Chitin and Chitosan*, The Japanese Society of Chitin and Chitosan, (1982), 205.
26. J. Ruiz-Herrera., *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*, R.A.A. Muzzarelli y E.R. Pariser (MIT Sea Grant Profram), (1978), Cambridge, MA.
27. Ravi Kumar MNV, *A review of chitin and chitosan applications*, Reactive & Functional Polymers 1, (2000), 46.
28. J. Ruiz-Herrera. *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*, (1978), .A.A. Muzzarelli y E.R. Pariser (MIT Sea Grant Profram),Cambridge.

29. G.W. Rigby. *Chemical Products and Process of Preparing the Same.*, US Patent 2, 072, 771, (1936) Estados Unidos de America.

30. Castelli, L. Bergamasco, P. L. Beltrame y B. Focher., *Some Insights Into the Kinetics of Non-conventional Alkaline Deacetylations of Chitin, Advances in Chitin Science* Vol. 1. C.J.A. Domard, (1996), 198-203, R. Muzarelli and G. Roberts editores (Jacques Andre Publisher).

31. <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&u=/netahtml/search-adv.htm&r=7&f=G&l=50&d=PTXT&p=1&p=1&S1=5,053,113&OS=5,053,113&RS=5,053,113>

32. [http://v3.espacenet.com/results?AB=chitosan&sf=q&FIRST=1&CY=ep&LG=en&DB=EPODOC&st=AB&kw=chitosan&Submit=SEARCH&=&=&=&=](http://v3.espacenet.com/results?AB=chitosan&sf=q&FIRST=1&CY=ep&LG=en&DB=EPODOC&st=AB&kw=chitosan&Submit=SEARCH&=&=&=&=&=)

33. G.L. Clark y A. F. Smith., *X-Ray Diffraction Studies of Chitin, Chitosan and Derivatives*, J. Phys. Chem., 40, (1936), 863-879.

34. CYTED IV.14, *Quitina y Quitosano, obtención caracterización y aplicación*, 1 ed., (2004) 40-41: Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

35. E.R. Hayes, D.H.Davies y V.G. Munroe., *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan.*, (1978), 103, R.A.A. Muzzarelli y E.R. Pariser (MIT Sea Grant Program), Cambridge.

36. M. Yalpani., *Chitin in Nature and Technology*, (1986), 403, (R.A.A. Muzarelli, C. Jeuniaux and G.W. Gooday), Ed. Plenum, Nueva York.

37. G.G. Allan, P. G. Jonson, Y.Z.Lay y K.V.Sarkanen. *Solubility and Reactivity of Marine Polymers in Dimethylformamide + Dinitrogen tetroxide*. Chem. Ind., (1971), 127.
38. CYTED IV.14, *Quitina y Quitosano, obtención caracterización y aplicación*, 1 ed., (2004) 157-158: Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
39. CYTED IV.14, *Quitina y Quitosano, obtención caracterización y aplicación*, 1 ed., (2004) 166: Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
40. Lapasin R and Princel S, *Rheology of Industrial Polysaccharids: Theory and Application*, Blackie Academic & Professional, (1995), New York.
41. R.A.A. Muzzarelli y R. Rocchetti., *Determination of the Degree of Acetylation of Chitosans by First Derivative Ultraviolet Spectrophotometry*, Carbohydr., Polym.5, (1985), 461-472.
42. A. Baxter, M. Dillon, K.D.A Taylor y G.A.F. Roberts. *Improved Method for I.R. Determination of the Degree of NAcetylation of Chitosan*, Int. J. Biol. Macromol. 14, (1992), 166-169.
43. J.Brugnerotto, J. Lizardi, F.M. Goycoolea, W. Argu  es-Monal, J. Desbri  res y M. Rinaudo. *An Infrared Investigation in Relation with Chitin and Chitosan Characterization*, Polymer 42, (2001), 3569-3580.
44. R.A.A. Muzzarelli y R. Rocchetti, *Determination of the Degree of Acetylation of Chitosan by First Derivate Ultraviolet Spectrophotometry*, Carbohydr. Polym., (1985), 4658-473.
45. Y. Inoue., *NMR Studies of the Structure and Properties of Cyclodextrins and their Inclusion Complex*, Ann. Rep. NMR Spectroscopy, (1993), 59-101.

46. P. Broussignac., *Chitosan: a Natural Polymer not Well Known by the Industry*, *Chemie & Industrie*, Genie Chimique 99 (9),(1968),1241-1247.
47. L. Raymond, F.G. Morin y R.H. Marchessault., *Degree of Deacetylation of Chitosan Using Conductimetric Titration and Solid-State NMR*, *Carbohydr. Res.* 246, (1993), 331-336.
48. CYTED IV.14, *Quitina y Quitosano, obtención caracterización y aplicación*, 1 ed., (2004) 158: Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
49. K. Kurita, S. Nishimura y T. Takeda. *Polym. J.* 22, (1991), 429.
50. N. Nishi, J. Noguchi, S. Tokura y H. Shiota, *Studies on Chitin I. Acetylation of Chitin*, *Polym. J.* 11, (1979), 27-32.
51. L. Szosland., *Di-O-butyrylchitin*, *Chitin Handbook*, R.A.A. Muzzarelli y M.G. Peters editores, Atec Edizioni, Grottammare, (1997), 53-60.
52. K. Kurita, H. Ichikawa, S. Ishizeki, H. Fujisaki y Y. Iwakura. *Makromol. Chem.* 183, (1982), 1161.
53. S. Hirano, N. Matsuda, O. Miura y H. Iwaki., *Some N-Arylidene Chitosan Gels*, *Carbohydr. Res.* 71, (1979), 339-343.
54. R.A.A. Muzzarelli, F. Tanfani, M. Emanuelli y S. Mariotti. *N-(Carboxymethylidene) chitosans and N-(Carboxymethyl) chitosans: Novel Chelating Polyampholytes Obtained from Chitosan Glyoxylate*, *Carbohydr. Res.* 107, (1982), 199-214.
55. R. L. Whistler, (edu.). *Polysaccharide Chemistry*, Academic Press-New York, (1983), 395.

56. M. Yalpani, F. Johnson y L. E. Robinson, *Chitin-Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications*, Elsevier-Amsterdam, (1992).
57. P. Sandford y A. Steiner, *Biomedical Application*.
58. R. A.A. Muzzarelli, M. Mattioli-Bellmonte, B. Muzzarelli, G. Mattei, M. Fini y G. Biagini, *Medical and Veterinary Applications of Chitin and Chitosan*. Advance in Chitin Sciences, Vol II.A. Domard, G. Roberts y K.M. Varun Eds.

(Jacques Andre Publisher), (1997), 580-589.
59. G.Skjak-Baek, T. Anthosen, P. Sandford, *Biomedical Applications of Chitin and its Derivatives Chitin and Chitosan Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications*, G. Skjak-Baek, T. Anthosen, P. Sandford Eds., Elsevier Sci., Eds., Elsevier Applied Sci, Londres, (1989), 813-825.
60. C. Brine, *Controlled Release Pharmaceutical Applications of Chitosan, Chitin and Chitosan Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications*, G. Skjak-Baek, T. Anthosen, P. Sandford Eds., Elsevier Sci., Londres, (1989), 679-681.
61. M.S. Rodriguez, V. Ramos, M. Pistonesi, L. Del Blanco y E. Agullo, *Preservación de Membrillos con películas de quitosano*, Información Tecnológica, 9 (3), (1998), 129-134.
62. H. F. Mark, N. M. Bikales, C. G. Overberger, G. Menges (eds.). *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, Vol. I, Wilay New York, (1985), 20.
63. Januzz M. Rosiak, I. Janik, S. Kadlubowski, M. Kozicki, P.Kujawa, P. Stasica and P. Ulanski, *Radiation Formation of Hydrogels for Biomedical Applications*, Institute

of Applied Radiation Chemistry, Technical University of Lodz Wroblewskiego 15, Lodz, Poland, 93-150.

64. Dinesh K., Alok R., *Radiation Grafting of N,N-Dimethylaminoethylmethacrylate onto Chitosan Films*, Centre of Engineering, Indian Institute of Technology, and All India Institute of Medical Sciences, New Delhi 110016-India, (1996), 869-870.

65. Japan Atomic Energy Research Institute, *Proceedings of the Takasaki Workshop on Bilateral Cooperations-Radiation Processing of Natural Polymers-November 1 and 2, 1999*, Jaeri, Takasaki, Japan, pp. 3, Eds. Tomikazu KUME, Yasunari MAEKAWA Functional Materials Laboratory I, (2000).

66. W. Hennink., C. Nostrum, *Novel Crosslinking methods to design hydrogels*, Department of Pharmaceutics, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences (UIPS), Utrecht University, (2001), 14-15.

67. W. Hennink., C. Nostrum, *Novel Crosslinking methods to design hydrogels*, Department of Pharmaceutics, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences (UIPS), Utrecht University, (2001), 15-17.

68. W. Hennink., C. Nostrum, *Novel Crosslinking methods to design hydrogels*, Department of Pharmaceutics, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences (UIPS), Utrecht University, (2001), 20-21.

69. W. Hennink., C. Nostrum, *Novel Crosslinking methods to design hydrogels*, Department of Pharmaceutics, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences (UIPS), Utrecht University, (2001), 22-27.

70. T. Miyata, N. Asami, T. Uragami, *Preparation of an antigen-sensitive hydrogel using antigen-antibody bindings*, *Macromolecules* 32, (1999), 2082-2084.

71. T. Miyata, N. Asami, T. Uragami, *A reversible antigen-responsive hydrogel*, Nature 399, (1999), 766-769.
72. Won Seok Choi, Kil Jin Ahn, Dong Wook Lee, Myung Woo Byun y Hyun Jin Park, *Preparation of Chitosan oligomers by irradiation*, Polymer Degradation and Stability 78 (2002) 533-538.
73. Dinesh K., Alok R., *Radiation Grafting of N,N Dimethylaminoethylmethacrylate onto Chitosan Films*, Centre of Engineering, Indian Institute of Technology, and All India Institute of Medical Sciences, New Delhi 110016-India, (1996), 870.
74. Dinesh K., Alok R., *Radiation Grafting of N,N Dimethylaminoethylmethacrylate onto Chitosan Films*, Centre of Engineering, Indian Institute of Technology, and All India Institute of Medical Sciences, New Delhi 110016-India, (1996), 871.
75. Commissariat 'a l'energie atomique dictionnaire des sciences et techniques nucléaires, Eyrolles Edited Paris, (1975), 299.
76. Rangrong Yoksan, Mitsuru Akashi, Mikiji Miyata y Suwabun Chirachanchai, *Optimal gRay Dose and Irradiation Conditions for Producing Low-Molecular-Weight Chitosan that Retains its Chemical Structure*, Radiation Research 161, (2004), 471.
77. Japan Atomic Energy Research Institute, *Proceedings of the Takasaki Workshop on Bilateral Cooperations-Radiation Processing of Natural Polymers-November 1 and 2, 1999*, Jaeri, Takasaki, Japan, pp. 42-43, Eds. Tomikazu KUME, Yasunari MAEKAWA Functional Materials Laboratory I, (2000).
78. <http://www.campoly.com/notes/002.PDF#search=%22gamma%20radiation%20crosslinking%22>
79. <http://www.greenpia.biz/eng/tech/09.php>

80. <http://www.campoly.com/notes/002.PDF#search=%22gamma%20radiation%20crosslinking%22>
81. Maolin Zhai, Long Zhao, Fumio Yoshii, Tamikazu Kume, *Study on antibacterial starch/chitosan blend film formed under the action of irradiation*, Carbohydrate Polymers 57 (2004) 83-88.
82. Le Hai, Tran Bang Diep, Naotsugu Nagasawa, Fumio Yoshii, Tamikazu Kume, *Radiation depolymerization of chitosan to prepare oligomers*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 208, (2003), 466-470.
83. Keisuke Kurita, *Preparation of Squid β -chitin*, Chitin Handbook, R.A.A. Muzzarelli and M.G. Peter, eds., European Chitin Society, (1997), 491-492.
84. A. Baxter, M. Dillon, K.D.A Taylor y G.A.F. Roberts. *Improved Method for I.R. Determination of the Degree of NAcetylation of Chitosan*, Int. J. Biol. Macromol. 14, (1992), 166-169.
85. L.H. Polymer Bulletin, 1997 George A.F Roberts, *Determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan*, Chitin Handbook, R.A.A. Muzzarelli and M.G. Peter, eds., European Chitin Society, (1997), 127-128.
86. Terbojevich and A. Cosani. *Molecular Weight determination of chitin and chitosan*, Chitin Handbook, R.A.A. Muzzarelli and M.G. Peter, eds., European Chitin Society, (1997), 87-91.
87. CYTED IV.14, *Quitina y Quitosano, obtención caracterización y aplicación*, 1 ed., (2004) 41: Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

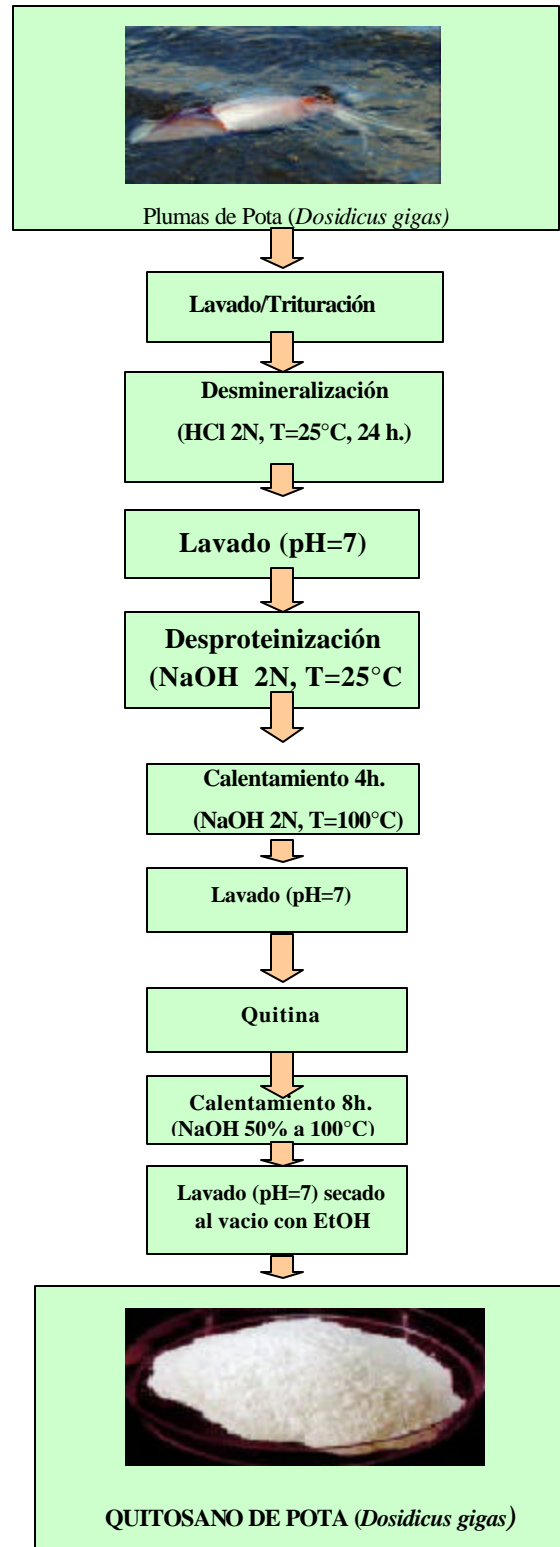
88. Keisuke Kurita, *Preparation of Squid β -chitin*, Chitin Handbook, R.A.A. Muzzarelli and M.G. Peter, eds., European Chitin Society, (1997), 492.
89. CYTED IV.14, *Quitina y Quitosano, obtención caracterización y aplicación*, 1 ed., (2004) 40: Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
90. Rangrong Yoksan, Mitsuru Akashi, Mikiji Miyata y Suwabun Chirachanchai, *Optimal γ Ray Dose and Irradiation Conditions for Producing Low-Molecular-Weight Chitosan that Retains its Chemical Structure*, Radiation Research 162, (2004), 471.
91. Wasikiewicz J, Yoshii F., Nagasawa N., Wach R., Mitomo H., *Degradacion of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods*, Radiation Physics and Chemistry 73, (2005), 287-295.
92. Nguyen D., Tran B., *A preliminary study on radiation treatment of chitosan for enhancement of antifungal activity tested on fruit-spoiling strains*, Nuclear Science and Technology, Vol. 2, No 2, (2003), 54-57.
93. Rangrong Yoksan, Mitsuru Akashi, Mikiji Miyata y Suwabun Chirachanchai, *Optimal γ Ray Dose and Irradiation Conditions for Producing Low-Molecular-Weight Chitosan that Retains its Chemical Structure*, Radiation Research 162, (2004), 477.
94. Carhuapoma B.W., Santiago C.J., *Caracterización de Hidrogeles de Quitosano-Alcohol Polivinílico obtenidos por Radiación Gamma*, Revista Iberoamericana de Polímeros, volumen 6(4),(2005), 333.
95. Escobar J.L, García D.M, Valerino A., Zaldivar D., Hernández E., Kattime I., *Influencia de la Temperatura y la composición de los copolimeros sobre el proceso de hinchamiento en hidrogeles de Poli-(N-isopropilacrilamida-CO-N,N,*

Dimetilacrilamida), Revista Iberoamericana de Polímeros, volumen 4(4),(2003), 38.

96. Rosa Ricciardi, Finizia Auriemma, Claudio De Rosa y Françoise Laupretre, *X-ray Diffraction of Poly(vinyl alcohol) Hidrogels, Obtained by Freezing and Thawing Techniques*, Dipartimento di Chimica Università di Napoli "Federico II" , Complesso Monte S. Angelo.

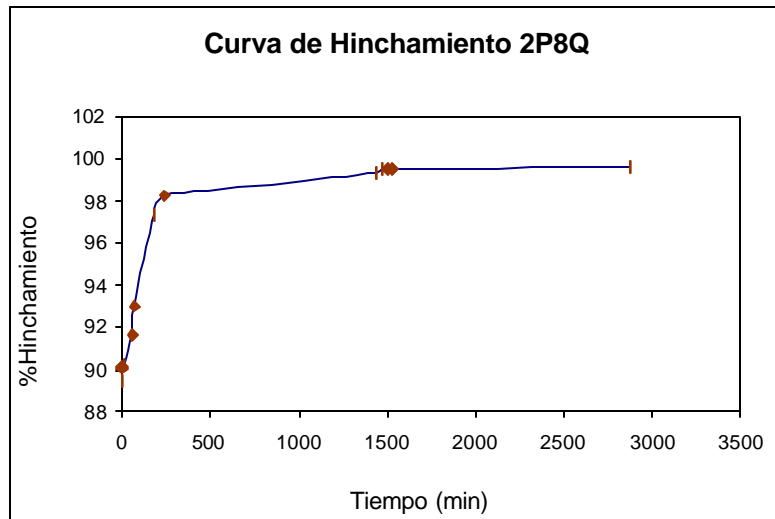
IX APÉNDICE

9.1.- Esquema de la obtención de Quitosano de Pota empleando el método convencional.

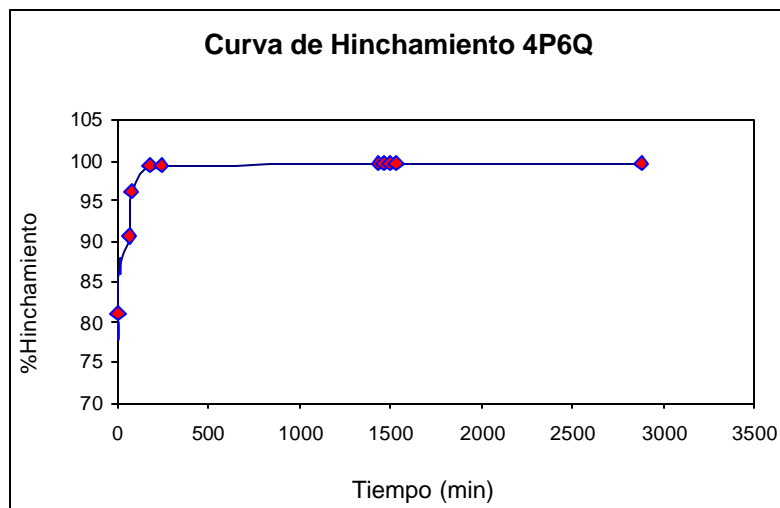


9.2.- CURVAS DE HINCHAMIENTO

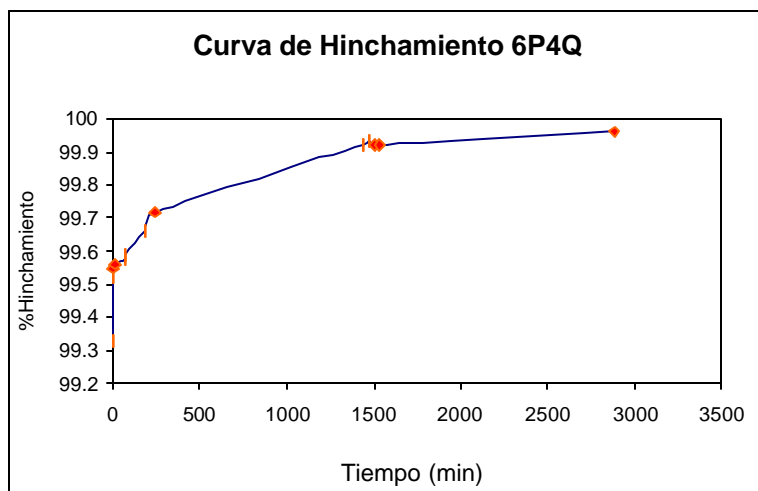
9.2.1.- Curva de Hinchamiento del Hidrogel 2P8Q



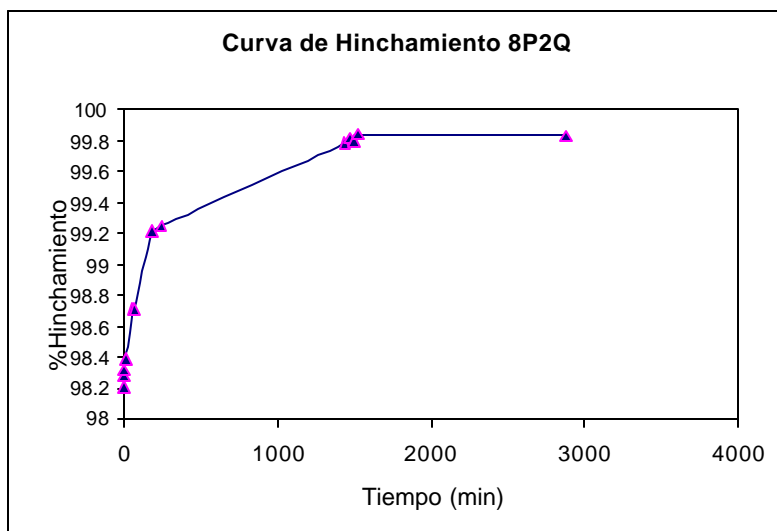
9.2.2.- Curva de Hinchamiento del Hidrogel 4P6Q



9.2.3.- Curva de Hinchamiento del Hidrogel 6P4Q



9.2.4.- Curva de Hinchamiento del Hidrogel 8P2Q



9.2.5.- Curva de Hinchamiento del Hidrogel 10P0Q

